

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018844

International filing date: 16 December 2004 (16.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-421948
Filing date: 19 December 2003 (19.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 17 February 2005 (17.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

20.12.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 2 月 1 9 日
Date of Application:

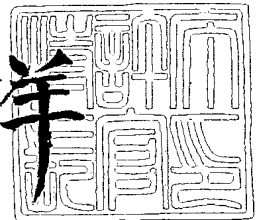
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 4 2 1 9 4 8
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 4 2 1 9 4 8]

出 願 人 浜 松 ホ ト ニ ク ス 株 式 有 限 公 司
Applicant(s):

2 0 0 5 年 2 月 3 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 2003-0791
【提出日】 平成15年12月19日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 21/64
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県浜松市市野町 1 1 2 6 番地の 1 浜松ホトニクス株式会社
 内
 【氏名】 勝又 政和
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県浜松市市野町 1 1 2 6 番地の 1 浜松ホトニクス株式会社
 内
 【氏名】 土屋 広司
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県浜松市市野町 1 1 2 6 番地の 1 浜松ホトニクス株式会社
 内
 【氏名】 小池 隆
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県浜松市市野町 1 1 2 6 番地の 1 浜松ホトニクス株式会社
 内
 【氏名】 西川 正隆
【特許出願人】
 【識別番号】 000236436
 【氏名又は名称】 浜松ホトニクス株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100088155
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 長谷川 芳樹
【選任した代理人】
 【識別番号】 100092657
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 寺崎 史朗
【選任した代理人】
 【識別番号】 100124291
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 石田 悟
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 014708
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

試験対象の水溶液サンプル中に存在する有害物質 (a toxic substance) を評価する有害物質の評価方法において、

前記水溶液サンプルに光合成機能を有する光合成サンプルを混合して試験計測溶液を調製し、前記試験計測溶液を所定の放置時間放置し、前記試験計測溶液に所定の照射時間光を照射した後に、発生する遅延蛍光の光量を計測する第 1 のステップと、

有害物質が存在しない標準サンプルに、前記光合成サンプルを混合して標準計測溶液を調製し、前記標準計測溶液を前記所定の放置時間放置し、前記標準計測溶液に前記所定の照射時間光を照射した後に、発生する遅延蛍光の光量を計測する第 2 のステップと、

前記第 1 のステップ及び前記第 2 のステップでそれぞれ計測された遅延蛍光の光量に基づいて評価値を算出し、前記評価値の比較値を求めることにより、前記水溶液サンプル中に存在する有害物質を評価する第 3 のステップと、
を備えることを特徴とする有害物質の評価方法。

【請求項 2】

前記評価値は、前記第 1 のステップ及び前記第 2 のステップで計測された遅延蛍光の光量の時間的変化の特徴点における、経過時間及び遅延蛍光の光量である、
ことを特徴とする請求項 1 記載の有害物質の評価方法。

【請求項 3】

前記評価値は、前記第 1 のステップ及び前記第 2 のステップで計測された遅延蛍光の光量の時間的変化であり、

前記比較値は、前記時間的変化の差をとった値である、
ことを特徴とする請求項 1 記載の有害物質の評価方法。

【請求項 4】

前記第 1 のステップ及び前記第 2 のステップにおいては、計測毎に光条件を変化させて、前記試験計測溶液及び前記標準計測溶液を所定の放置時間放置し、

前記第 3 のステップにおいては、前記光条件に応じた前記比較値の変化を評価する、
ことを特徴とする請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の有害物質の評価方法。

【請求項 5】

前記試験計測溶液中及び前記標準計測溶液中における前記光合成サンプルの密度は、遅延蛍光の光量と比例関係を有する密度の範囲である、
ことを特徴とする請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の有害物質の評価方法。

【請求項 6】

前記第 1 のステップ及び前記第 2 のステップにおいては、遅延蛍光の光量を計測する前に、前記試験計測溶液及び前記標準計測溶液を均一化させる、
ことを特徴とする請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の有害物質の評価方法。

【請求項 7】

試験対象の水溶液サンプル中に存在する有害物質を評価するための有害物質の評価用キットであって、

前記水溶液サンプルに混合される光合成サンプルと、

前記水溶液サンプルの塩濃度及び pH を調整するための混合塩類と、

前記光合成サンプルと前記混合塩類とを、前記水溶液サンプルに分離して混合させる混合手段と、

を備えることを特徴とする有害物質の評価用キット。

【書類名】明細書

【発明の名称】有害物質の評価方法、及び有害物質の評価用キット

【技術分野】

【0001】

本発明は、有害物質の評価方法、及び有害物質の評価用キットに関するものである。

【背景技術】

【0002】

従来から、環境中に存在する未知化学物質の生物に対する影響を評価する方法として、細菌、藻類、ミジンコ、魚類等の生物個体に対する生育阻害を検査する生物学的な毒性検査「バイオアッセイ」が用いられている。バイオアッセイは、未知物質や想定外の物質による影響、化学物質の相互作用、及び環境による影響等の生物学的な影響を総合的に検出可能な点で、既存の物理化学的方法である、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、原子吸光計測法、酵素免疫アッセイ等と相補関係にある。

【0003】

このバイオアッセイにおいては、多量の個体を統計的に処理可能な、かつライフサイクルの短い細菌、藻類などの単細胞生物、また小形甲殻類（ミジンコ）、及び小形魚類などの、比較的に高等な生物機能を有しつつ化学物質等の影響を受けやすい小形水生生物等が用いられている。バイオアッセイの具体的手法としては、日本国環境省の指針において規定されている藻類増殖阻害試験による生体影響評価が挙げられる。藻類増殖阻害試験は、藻類に対する被験物質の様々な毒性を評価する方法である。

【0004】

また、その他の手法として、非特許文献1に記載の発光バクテリアの発光計測により呼吸阻害を計測する方法や、非特許文献2に記載の藻類からのクロロフィル蛍光を用いた光合成阻害性の計測方法が考案されている。

【非特許文献1】Strategic Diagnostics社、“Strategic Diagnostics Inc. web page”、[online]、[平成15年11月17日検索]、インターネット<URL: <http://www.azurenv.com/mt ox.htm>>

【非特許文献2】Ulrich Schreiber、外3名、[New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorescence meter for highly sensitive water toxicity biotests] Photosynthesis Research, (オランダ), Kluwer Academic Publishers, 74, p. 317-330

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、上述した藻類増殖阻害試験による生体影響評価方法においては、生物自体を試験対象とするため操作が煩雑となるとともに、試験結果を得るまで24時間～72時間という長時間を要する。これに対して、上記非特許文献1及び上記非特許文献2に記載の計測方法においては、試験時間の短縮化は一部実現されているが未だ十分ではない。加えて、いずれの評価方法においても未知化学物質等の幅広い有害物質の定性的及び定量的な分析を実現するには至っていない。

【0006】

そこで、本発明はかかる課題に鑑みて為されたものであり、短時間でかつ幅広い有害物質の分析を行うことが可能な有害物質の評価方法、及び有害物質の評価用キットを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明の有害物質の評価方法は、試験対象の水溶液サンプル中に存在する有害物質を評

価する有害物質の評価方法において、水溶液サンプルに光合成機能を有する光合成サンプルを混合して試験計測溶液を調製し、試験計測溶液を所定の放置時間放置し、試験計測溶液に所定の照射時間光を照射した後に、発生する遅延蛍光の光量を計測する第1のステップと、有害物質が存在しない標準サンプルに、光合成サンプルを混合して標準計測溶液を調製し、標準計測溶液を所定の放置時間放置し、標準計測溶液に所定の照射時間光を照射した後に、発生する遅延蛍光の光量を計測する第2のステップと、第1のステップ及び第2のステップでそれぞれ計測された遅延蛍光の光量に基づいて評価値を算出し、評価値の比較値を求めることにより、水溶液サンプル中に存在する有害物質を評価する第3のステップと、を備えることを特徴とする。

【0008】

このような有害物質の評価方法では、評価対象の水溶液サンプルに混合された光合成サンプルから発せられる遅延蛍光の光量の時間的変化と、有害物質が存在しない溶液中の光合成サンプルから発せられる遅延蛍光の光量の時間的変化とを比較して得られる特徴から、複数の有害物質を同時に、かつ精度良く定性、定量することができる。また、遅延蛍光の光量を計測して評価することにより、計測時間を全体的に短縮化することができる。

【0009】

また、評価値は、第1のステップ及び第2のステップで計測された遅延蛍光の光量の時間的変化の特徴点における、経過時間及び遅延蛍光の光量であることが好ましい。この場合、遅延蛍光の光量の時間的変化の特徴点は有害物質となる化学物質種などに応じて変化するため、その特徴点における経過時間及び遅延蛍光の光量を評価することでよりの確に各種有害物質を定性及び定量することができる。

【0010】

さらに、評価値は、第1のステップ及び第2のステップで計測された遅延蛍光の光量の時間的変化であり、比較値は、時間的変化の差をとった値であることも好ましい。こうすれば、遅延蛍光量の時間的変化の変曲点等の特徴を得ることができ、有害物質となる化学物質種などの特定が容易に為される。

【0011】

またさらに、第1のステップ及び第2のステップにおいては、計測毎に光条件を変化させて、試験計測溶液及び標準計測溶液を所定の放置時間放置し、第3のステップにおいては、光条件に応じた比較値の変化を評価することも好ましい。かかる方法とすれば、光条件の遅延蛍光特性に対する影響が有害物質毎に異なるので、放置時の光条件の変化に応じた比較値を評価することにより、水溶液サンプル中の有害物質の判別が更に容易となる。

【0012】

さらにまた、試験計測溶液中及び標準計測溶液中における光合成サンプルの密度は、遅延蛍光の光量と比例関係を有する密度の範囲であることも好ましい。この場合、例えば、吸光度等を測定して光合成サンプルの密度を計測した後、この密度に基づいて遅延蛍光の光量を補正することにより、より精度の高い有害物質の評価が実現される。

【0013】

加えて、第1のステップ及び第2のステップにおいては、遅延蛍光の光量を計測する前に、試験計測溶液及び標準計測溶液を均一化させることも好ましい。こうすれば、計測中において計測溶液中の光合成サンプルが均一に分布されるので、さらに誤差の少ない有害物質の評価が可能となる。

【0014】

そして、このような評価のために、試験対象の水溶液サンプル中に存在する有害物質を評価するための有害物質の評価用キットであって、水溶液サンプルに混合される光合成サンプルと、水溶液サンプルの塩濃度及びpHを調整するための混合塩類と、光合成サンプルと混合塩類とを、水溶液サンプルに分離して混合させる混合手段と、を備える有害物質の評価用キットが提供される。

【発明の効果】

【0015】

本発明の有害物質の評価方法によれば、短時間でかつ幅広い有害物質の分析を行うことができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本発明の実施形態について図面を参照して説明する。なお、各図において、同一要素には同一符号を付して重複する説明を省略する。

【0017】

(遅延蛍光計測装置)

まず、本発明による有害物質の評価方法を実施するための遅延蛍光計測装置について説明する。図1は、遅延蛍光計測装置の一実施形態を示す図であり、図2は、遅延蛍光計測装置を部分的に示すブロック図である。

【0018】

遅延蛍光計測装置1は、光源10、第1測定部12、第2測定部14、解析部16および制御部18を備えている。光源10は、測定対象の溶液に所定波長の測定光を照射するものであって、その波長は、280nm～800nmである。ここで、光源10は、単色光源であっても、複数の光源を組み合わせた光源であってもよい。光源10の発光は、所定時間連続してもよいし、任意のパターンでパルス点灯させてもよい。また、同一または異なる波長特性を有する複数の光源を順番に発光させたり、複数の光源を同時に発光させたりしてもよい。

【0019】

第1測定部12は、測定光に対する溶液の吸光度または散乱光の光量を測定するものであり、溶液に照射された測定光の透過光または散乱光を検知する第1光センサ12aと、第1光センサ12aが検知して出力する信号に基づいて吸光度または散乱光の光量を算出する吸光度または散乱光量算出部12bとを有している。

【0020】

第2測定部14は、測定光が照射されたことによって光合成サンプル（詳細は、後述する。）から生じる遅延蛍光の光量を測定するものであり、遅延蛍光を検知する第2光センサ14aと、第2光センサ14aが検知して出力する信号に基づいて遅延蛍光の光量を算出する遅延蛍光量算出部14bとを有している。ここで、遅延蛍光は以下のようにして生じる。つまり、光合成機能を有する生物反応において、同化色素（光合成色素）に吸収された光エネルギーが、電子伝達経路により化学的エネルギーとして生物反応中に伝達される。その伝達過程で、化学エネルギーの一部が逆反応を起こし、光合成色素がその化学エネルギーにより再励起される。このようにして再励起された光合成色素から蛍光発光が生じる。なお、遅延蛍光は遅延発光と呼ばれることもあり、以下総称して遅延蛍光とする。

【0021】

光源10、第1測定部12および第2測定部14は、遮光性を有する筐体20に收容されている。筐体20は、それ自体が光を遮断する遮光部材で形成されてもよく、光を遮断する塗料等を塗布した部材で形成されてもよい。

【0022】

筐体20は、本体部22と蓋部24とを有している。本体部22は、その一端側に導入口26が形成されている。導入口26は、筐体20内に光合成サンプルを含む溶液を入れるために形成されており、蓋部24により閉塞されるようになっている。

【0023】

また、筐体20内には、溶液を入れた容器（図示せず）を設置可能な設置部28が光源10と第1測定部12との中間付近に設けられている。設置部28は、例えば、容器固定用の固定爪を有し、この固定爪で容器を固定するようになっている。

【0024】

筐体20内の設置部28と第2測定部14との間には、フィルタ30、集光光学系32およびシャッタ34が設けられている。フィルタ30は、筐体20の内壁面に接するように設けられ遅延蛍光を透過するものである。集光光学系32は、微弱な遅延蛍光を集光す

るものである。シャッタ34は、開閉自在にされており、閉じているときは遅延蛍光を遮断するようになっている。

【0025】

解析部16は、第1ケーブル36を介して第1測定部12と第2測定部14とに接続されており、算出部38、記憶部40および表示部42を有している。算出部38は、第1測定部12により測定された吸光度または散乱光の光量、および第2測定部14により測定された遅延蛍光の光量に基づいて、後述する演算方法に従って、溶液中に存在する有害物質に相関する比較値を求める。記憶部40は、算出部38により求められた比較値を順次記憶するものである。表示部42は、記憶部40に順次記憶された複数の比較値を表示又は図示するものである。

【0026】

制御部18は、第2ケーブル44を介して解析部16に接続されている。すなわち、制御部18は、第2ケーブル44および第1ケーブル36を介して、第1測定部12および第2測定部14に接続されていることとなる。また、制御部18は、蓋部24の開閉、光源10の発光や発光の停止およびシャッタ34の開閉を制御する制御信号を送信する。

【0027】

(有害物質の評価方法)

次いで、本発明による有害物質の評価方法について詳細に説明する。図3は、有害物質としての生物生育阻害要因の評価方法の手順を示すフローチャートである。この評価方法は、試験対象の水溶液サンプル中に存在する生物生育阻害要因を評価するためのものである。ここで、生物生育阻害要因とは、細菌、藻類、ミジンコ、魚類等の生物個体に対して生育阻害作用や毒性等の悪影響を与える要因のことである。

【0028】

まず、キュベット等の容器内において試験対象となる水溶液サンプルと調整溶液とを混合する(ステップS01)。

【0029】

水溶液サンプルとしては、湖沼河川や井戸水など天然の水源から直接採取した水、土壌や汚泥など固形物から一般的な抽出手法によって得られる抽出成分を含む水溶液、野菜等農産物が散布された物体の表面を洗い流した水溶液、ガス成分を液体に吸収させることにより得られる水溶液、植物や動物など(野菜や食肉など)から一般的な抽出手法によって得られる抽出成分を含む水溶液、及び植物や動物から採取された組織液、血液、乳汁、糞尿などの排泄物から一般的な抽出手法によって得られる抽出成分を含む水溶液などが利用できる。また、上記水溶液サンプルは、予め溶媒抽出や固相抽出などによる分画処理により、水溶性物質、疎水性物質等の特性の異なる成分に分離または濃縮したものをを用いることができる。

【0030】

調整溶液は、水溶液サンプルの塩濃度、pHを調整するための各種塩類を含む溶液である。光合成サンプルを用いた遅延蛍光計測に用いる計測溶液を調製する場合、水溶液サンプルは未知の水溶液であり、その塩濃度、pHなどが多様である場合が多い。なお、塩濃度、pHが適切な範囲に無い場合は光合成サンプルの光合成機能に影響を与えることが知られている。そこで、調整溶液は、計測溶液の塩濃度、pHを調整するために用いられる。さらに、高感度な計測を行うためには、キュベット中の計測溶液における光合成サンプルの分布密度が均一で偏りが無いこと、計測中に沈殿物や浮上物が生じないことが好ましい。このために、調整溶液は、計測溶液における光合成サンプルの分布密度に偏りが発生しないよう均一化するための安定化剤を含有することが好ましい。例えば、計測溶液にある程度の粘性を持たせたり、比重を光合成サンプルと一致させたりすることにより均一化が可能である。

【0031】

調整溶液の溶質としては、例えば、水溶液サンプルの塩濃度、pHを光合成サンプルに適した条件に調整する混合塩類、光合成サンプルの計測溶液における分布密度を均一化す

る安定化剤、及び光合成反応に最低限必要な栄養塩類などが挙げられる。また、調整溶液に含まれる安定化剤としては、計測中の光合成サンプルの空間的安定化に必要な比重調整剤や、ゲル化剤（増粘剤）などを用いることが可能である。このような比重調整剤を用いることにより、計測溶液の比重が光合成サンプルとほぼ一致するように調整される。また、この安定化剤は、調整溶液に代えて、後述する光合成サンプルに含ませておいても良い。

【0032】

次に、キュベット等の容器内において、調整溶液によって調整された水溶液サンプルに光合成サンプルが混入され、試験計測溶液として調製される（ステップS02）。この場合、試験計測溶液中の光合成サンプルが均一の濃度となるように混合される。

【0033】

光合成サンプルとは、光合成機能を有するものであって、遅延蛍光を発光可能なものであればよく、例えば藻類又は植物性プランクトン、シアノバクテリア、光合成細菌、植物体や葉や又はその細片、カルスなどの植物性培養細胞、植物から抽出された光合成小器官やチラコイド膜、さらには人工的に合成された光合成様機能を持つ膜・タンパク複合体などが挙げられる。好適には、例えば、藍藻類である *Spirulina*、緑藻類である *Selenastrum* や、黄色藻類である *Isochrysis*、また、ハウレンソウなどから抽出されたチラコイド膜などが利用できる。

【0034】

上記のようにして調製された試験計測溶液を所定の光条件のもとで所定の放置時間放置する（ステップS03）。光条件とは、放置時において試験計測溶液に照射される光の波長、光量、合成光である場合の各成分の波長及び光量というような環境条件のことをいうものとする。

【0035】

そして、以下のようにして、試験計測溶液から発せられる遅延蛍光の光量を計測して、遅延蛍光の光量の時間的変化を測定する（ステップS04）。

【0036】

図4は、遅延蛍光の光量を測定する際の遅延蛍光計測装置1の動作を示すフローチャートである。なお、筐体20内の設置部28には、試験計測溶液を入れた容器が設置されているものとする。

【0037】

まず、制御部18は、光源10を発光させる制御信号を送信する。これにより、光源10は発光する（ステップS401）。この発光は、光合成サンプルを計測光に順応させるための予備的な光照射を試験計測溶液に対して行った後、遅延蛍光を生じさせるための光照射を所定の照射時間行う。光源10が発光すると、第1測定部12は試験計測溶液の吸光度または散乱光の光量を測定する（ステップS402）。測定後、第1測定部12は、吸光度または散乱光の光量に関する情報を算出部38に送信する。その後、制御部18は光源10の発光を停止させる制御信号を送信する。これにより、光源10は発光を停止する（ステップS403）。

【0038】

発光停止後、制御部18はシャッター34を開動作させる制御信号を送信する。これにより、シャッター34は開動作する（ステップS404）。シャッター34が開動作すると、第2測定部14は遅延蛍光の光量を測定する（ステップS405）。測定後、第2測定部14は、所定の計測時間における遅延蛍光の光量の時間的変化に関する情報を算出部38に送信する。その後、制御部18は、シャッター34を閉動作させる制御信号を送信する。これにより、シャッター34は閉動作する（ステップS406）。

【0039】

ここまでの処理で試験計測溶液に関する遅延蛍光量の計測（第1のステップ）が完了する。

【0040】

次に、図3に戻って、ステップS01と同一の条件で、キュベット等の別の容器内において標準サンプルと調整溶液とを混合する（ステップS05）。ここで、標準サンプルは、生物生育阻害要因といった有害物質が存在しないことが既知の溶液であり、例えば、滅菌蒸留水や純水等の不純物、菌類が取り除かれた水が用いられる。

【0041】

そして、ステップS02と同一の条件で、キュベット等の容器内において調整溶液によって調整された標準サンプルに光合成サンプルが混入され、標準計測溶液として調製される（ステップS06）。以下、ステップS03～S04と同様にして、標準計測溶液の遅延蛍光量の計測が行われる（ステップS07～ステップS08、以上、第2のステップ）。

。

【0042】

なお、上述した遅延蛍光量の計測（ステップS401～S406）は、計測精度を上げるために、試験計測溶液又は標準計測溶液について複数回繰り返し行って、その平均値を算出するようにしても良い。

【0043】

試験計測溶液及び標準計測溶液の遅延蛍光量の時間的変化、及びそれぞれの測定時の吸光度（又は散乱光の光量）が計測されると、算出部38は、それらの遅延蛍光量の時間的変化に基づいて、生物生育阻害要因に相関する比較値を求める（ステップS09）。

【0044】

図5は、標準的測定条件下の遅延蛍光の光量の時間的変化の例を示す図である。ここで標準的測定条件とは、以下の通りである。まず、光合成サンプルとして、光強度 $50\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、波長665nmの赤色単色光下で一般的な方法で育成された藍藻類である*Spirulina platensis*、標準サンプルとして、1.8mlの滅菌蒸留水を用意する。次に、4倍濃度の標準的な藍藻培養用混合塩類と、pH及び塩濃度を調整するための混合塩類とを含む0.6mlの調整溶液を標準サンプルに添加する。次いで、665nmの吸光度に換算して、 $\text{OD}=0.1$ 程度で均一である*Spirulina platensis*と、ゲル化剤として0.5重量%の寒天とを含む0.6mlの光合成サンプルを混合して、3mlの計測溶液を調製する。その後、光強度 $1.5\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の白色蛍光灯下で15分程度放置する。そして、遅延蛍光計測装置1を用いて、光合成サンプルを計測光条件に順応させるための予備的な光照射として665nm、 $0.8\text{mW}/\text{cm}^2$ の光を2秒照射後に、60秒間暗黒下で待機させる。その後、再度665nm、 $0.8\text{mW}/\text{cm}^2$ の励起光を2秒照射後に、時間分解能0.1秒で60秒間の遅延蛍光の光量を計測する。上記60秒間の計測を3回実行して、その平均値から遅延蛍光の光量の時間的変化が得られる。なお、水溶液サンプルについても同様である。

【0045】

図5に示されるように、得られる遅延蛍光減衰カーブ（遅延蛍光の光量の時間的変化）は、光照射終了後から続く減衰カーブの頂点である第1ピーク（P1）と、光照射終了後25～35秒近辺に現れる第二ピーク（P2）を有する。また、第1ピーク（P1）と第2ピーク（P2）の間におけるP1の近傍には、変曲点（C1）が現れる。これらP1、P2、及びC1（特徴点）は生物生育阻害要因の種類により特徴的な変化を示す。この特徴点の変化は、光合成サンプルの生物生育阻害要因に対する感受性の変化からもたらされる。また、この特徴点としては、上記3つの点には限られず、P1とP2の間の極小点や、遅延蛍光減衰カーブにおけるその他の変曲点を用いることもできる。

【0046】

ここで、算出部38は、試験計測溶液及び標準計測溶液の遅延蛍光減衰カーブ中の特徴点を検出し、その特徴点を評価する評価値を算出する。この評価値としては、P1における遅延蛍光量CP1、P2における遅延蛍光量CP2、及びP2における光照射終了後の経過時間TP2が用いられる。また、変曲点C1を評価するための評価値としては、試験計測溶液及び標準計測溶液の遅延蛍光の光量の時間的変化の値を用いる。

【0047】

そして、算出部38は、それぞれの計測溶液の測定時の吸光度（又は散乱光の光量）に

基づいて遅延蛍光の光量又は評価値を補正することを行う。この補正は、計測溶液中の光合成サンプルの濃度差により生ずる測定誤差を補正するためのものである。この測定誤差は、特に光合成サンプルの極微量変化領域を評価する場合に、設置部 28 での光合成サンプルの配置、あるいは設置部 28 自身の配置などで光照射量、光路が変化することにより生ずる。この補正には、吸光度（又は散乱光の光量）を基にして計測された細胞密度を用いることが有効である。

【0048】

上記補正を精度良く行うためには、試験計測溶液中及び標準計測溶液中における光合成サンプルの密度は、それぞれに関する遅延蛍光の光量と比例関係を有する密度の範囲であることが好ましい。つまり、計測溶液中の光合成サンプル密度がある値以下では、吸光度（又は散乱光の光量）と、遅延蛍光の光量とは、光合成サンプル密度と高い相関を示す。この密度の上限値は、光合成サンプルの特性毎に適宜設定される。図 6 において、(a) は、波長 665nm の吸光度 (OD665) と遅延蛍光量 CP1 との関係の一例、(b) は、波長 750nm の吸光度 (OD750) と遅延蛍光量 CP1 との関係の一例を示す。図 6 の例によれば、吸光度と遅延蛍光量 CP1 は、吸光度 (OD) = 0.5 付近まで高い相関がある。しかし、OD = 0.5 以上では、光合成サンプル自体の自己吸収により遅延蛍光量が見かけ上減少している事がわかる。従って、この場合、吸光度が OD = 0.5 以下の範囲内であれば、それを元に遅延蛍光量の補正が高精度に為され得る。

【0049】

次いで、算出部 38 は、評価値から水溶液サンプル中の生物生育阻害要因による影響を顕在化させるための比較値を算出する。比較値の例としては、試験計測溶液及び標準計測溶液から得られた CP1、CP2、TP2 の比をとって得られた VCP1 値、VCP2 値、VTP2 値、試験計測溶液及び標準計測溶液から得られた遅延蛍光の光量の時間的変化の差をとって得られた Curve 値が用いられる。これら比較値を評価することで光合成サンプルの生物生育阻害要因に対する感受性が適切に評価される。なお、以下本明細書において、CP1 は、光照射終了後 0.1 秒から 0.5 秒までの遅延蛍光量積算量 [counts]、TP2 は、第 2 ピーク（又は類似の変曲点）の現れる光照射終了後経過時間 [sec]、CP2 は、第 2 ピーク（又は類似の変曲点）の現れる時刻 ± 0.5 秒の遅延蛍光量積算量 [counts]、Curve 値は、C1 を含む第 1 ピークと第 2 ピークとの間の遅延蛍光減衰カーブの、試験計測溶液と標準計測溶液との差 [counts]、VCP1 値、VCP2 値、VTP2 値は、それぞれ CP1、CP2、TP2 の、標準計測溶液に対する試験計測溶液の比として算出されるものとする。

【0050】

また、このように算出された比較値により高感度で生物生育阻害要因を検出するためには、上述した遅延蛍光の光量と比例関係を有する光合成サンプル密度の範囲内であっても、光合成サンプルは十分に低密度であることが好ましい。

【0051】

図 7 には、波長 665nm の吸光度に対する VCP1 値の変化を示す。この VCP1 値は、濃度 0.1ppb の DCMU を含む水溶液サンプル、及び光合成サンプル *Spirulina platensis* を混合した計測溶液を対象に計測を行った結果得られたものである。また、標準計測溶液を計測対象にした場合、吸光度 0.5 以下において吸光度と遅延蛍光の光量とが高い相関を示した。図 7 により示されるように、光合成サンプル密度が OD = 0.1 より高くなるに従い、VCP1 値 (%) が低下する。一方では遅延蛍光の光量と光合成サンプル密度の相関は、吸光度 0.5 付近まで保たれている。このことから、遅延蛍光の光量が自己吸収により減衰しない光合成サンプル密度の範囲においても、光合成サンプル密度が比較的高い場合、生物生育阻害要因の検出感度が低下することがわかる。光合成サンプルへの生物生育阻害性は、水溶液サンプル中の化学物質が光合成サンプル中に浸透吸収されて、特定の標的生体分子と直接もしくは間接的に相互作用することにより発生する。このため、極低濃度の化学物質に対して、過剰の光合成サンプル（＝標的生体分子）が存在する場合には影響が低下する結果となる。

【0052】

図 3 に戻って、比較値が求められると、記憶部 40 は比較値を記憶し（ステップ S10

)、表示部 42 は記憶された比較値を表示する (ステップ S11)。ここでの表示は、例えば、記憶された比較値がグラフ表示等することにより行われる。また、以前記憶された他の水溶液サンプルに関する比較値と対比できるように並べて表示等することも好ましい。最後に、表示された比較値を既知物質の比較値と対比して解析することにより、水溶液サンプルにおける生物生育阻害要因の定性・定量が行われる (ステップ S12、以上、第 3 のステップ)。ステップ S12 における解析・評価方法の詳細については後に詳述する。

【0053】

なお、ステップ S03 における計測溶液の放置時の光条件は、安定して高感度計測を行うために所定の条件に制御することが好ましい。また、光合成サンプルを明所から暗所に移動した場合などには、光合成サンプルが経時的に徐々にその環境に適応していくために、測定前から光合成サンプルを一定の光条件で保存しておいたり、光合成サンプルを置く光環境を変化させた後、所定時間経過後に遅延蛍光の計測を行うとより好適である。

【0054】

図 8 には、光合成サンプルとして *Spirulina platensis* を使用した場合に、計測溶液放置時の光強度を様々変化させた場合の評価値の一例を示す。図 8 において、(a) は、光強度を変化させた場合の CP1、(b) は、光強度を変化させた場合の CP2、(c) は、光強度を変化させた場合の TP2 を示す。図 8 に示すように、測定前に強光下での明所においた計測溶液では、CP1 が他の光強度に比して大きく、弱光においた計測溶液では、CP2 が他の光強度に比して大きく、暗黒においた計測溶液では、TP2 が他の光強度に比して大きくなっている。このように、光合成サンプルから発せられる遅延蛍光は、放置状態での光強度により変化し、その結果、遅延蛍光減衰カーブの計測・評価結果に影響する事がわかる。このような理由から、計測溶液の放置時の光条件を所定の条件に制御することは、遅延蛍光減衰カーブ中の極大点、極小点、変曲点などの特徴点を再現性良く安定して測定・評価するために重要である。

【0055】

また、計測溶液に混合される光合成サンプルは、再現性の良い計測結果を得るために所定の培養条件で育成したものをを用いることが好ましい。このような所定の培養条件としては、一定の光環境下 (例えば、照射波長、照射強度) であることが好ましい。また、単色光源で育成したものを低温下にて暗黒もしくは所定の光照射強度 (例えば、光強度 $1 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$) で保存して、増殖が抑制された培養条件であることがより好ましい。

【0056】

図 9 には、異なる光環境で育成された光合成サンプル *Spirulina platensis* を使用した場合の評価値を示す。図 9 において、(a) は、培養条件 (光波長) を変化させた場合の CP1、(b) は、光波長を変化させた場合の CP2、(c) は、光波長を変化させた場合の TP2 を示す。図 9 に示すように、遅延蛍光減衰カーブは光環境により変化することから、得られる評価値も変動する。このような理由から、所定の培養条件で光合成サンプルを育成することは、規格化された高感度計測を行うために重要である。

【0057】

(既存物質の計測)

以下、上述した標準的測定条件下において、生物生育阻害要因となる既存化学物質を含む水溶液サンプルについての遅延蛍光計測の解析結果を示す。

【0058】

図 10 及び図 11 は、アトラジンを経々な濃度で含む水溶液サンプルを対象に算出された比較値を示すグラフである。図 10 において、(a) は、アトラジン濃度に対する VCP1 値の変化を示すグラフ、(b) は、アトラジン濃度に対する VCP2 値の変化を示すグラフ、(c) は、アトラジン濃度に対する VTP2 値の変化を示すグラフである。また、図 11 は、アトラジン濃度を変化させた場合の Curve 値を示すグラフである。アトラジンは光合成を阻害する疎水性除草剤として利用されていたが、 $20 \mu\text{g/l}$ 程度の低濃度でカエル等に催奇形作用をしめす内分泌攪乱作用が認められ、規制の対象になっている化学物

質である。なお、図中に表記されているアトラジン濃度は、最終的に合計3mlに調整された試験計測溶液中での濃度である。

【0059】

図10に示すように、アトラジン濃度の増加に応じて、VCP1値が増大する一方、VCP2値が減少することがわかる。また、アトラジン濃度の増加に応じて、VTP2値は若干減少する。図11により、Curveは低濃度ではほとんど変化しないが、高濃度になるにつれて、経過時間1～2秒付近で時間分布がマイナス側に変化していくことが判明した。

【0060】

また、図12及び図13は、DCMU（ジウロン）を様々な濃度で含む水溶液サンプルを対象に算出された比較値を示すグラフである。図12において、(a)は、DCMU濃度に対するVCP1値の変化を示すグラフ、(b)は、DCMU濃度に対するVCP2値の変化を示すグラフ、(c)は、DCMU濃度に対するVTP2値の変化を示すグラフである。また、図13は、DCMU濃度を変化させた場合のCurve値を示すグラフである。DCMU（ジウロン）はアトラジンと同様に、光合成を阻害する除草剤として幅広く利用されてきたが、生物への悪影響が指摘されており、規制の対象となっている。なお、図中に表記されているDCMU濃度は、最終的に合計3mlに調整された試験計測溶液中での濃度である。

【0061】

図12に示すように、DCMU濃度の増加に応じて、VCP1値が増大する一方、VCP2値が減少することがわかる。また、DCMU濃度の増加に応じて、VTP2値はほとんど変化しない。また、図13により、Curveは低濃度ではほとんど変化しないが、高濃度になるにつれて、経過時間1～2秒付近で時間分布がマイナス側に変化していくことが判明した。

【0062】

また、図14及び図15は、パラコートを様々な濃度で含む水溶液サンプルを対象に算出された比較値を示すグラフである。図14において、(a)は、パラコート濃度に対するVCP1値の変化を示すグラフ、(b)は、パラコート濃度に対するVCP2値の変化を示すグラフ、(c)は、パラコート濃度に対するVTP2値の変化を示すグラフである。また、図15は、パラコート濃度を変化させた場合のCurve値を示すグラフである。パラコートは細胞中に取り込まれた後に、生体反応の電子伝達を攪乱したり、活性酸素を発生することにより細胞に障害を起こすとされており、除草剤として利用されている。なお、図中に表記されているパラコート濃度は、最終的に合計3mlに調整された試験計測溶液中での濃度である。

【0063】

図14に示すように、パラコート濃度の増加に応じて、VCP2値及びVTP2値が減少するが、高濃度でその減少が鈍くなる。また、パラコート濃度の増加に応じて、VCP1値は低濃度において若干減少する。また、図15により、Curveは、高濃度になるにつれて経過時間1～2秒付近で時間分布がマイナス側に変化することが判明した。

【0064】

また、図16及び図17は、無機水銀を様々な濃度で含む水溶液サンプルを対象に算出された比較値を示すグラフである。図16において、(a)は、無機水銀濃度に対するVCP1値の変化を示すグラフ、(b)は、無機水銀濃度に対するVCP2値の変化を示すグラフ、(c)は、無機水銀濃度に対するVTP2値の変化を示すグラフである。また、図17は、無機水銀濃度を変化させた場合のCurve値を示すグラフである。無機水銀は、光合成サンプルだけでなく一般的な細胞にも毒性を示す物質である。なお、図中に表記されている無機水銀濃度は、塩化水銀溶液として調製し、最終的に合計3mlに調整された試験計測溶液中での水銀イオン濃度換算での濃度である。

【0065】

図16に示すように、無機水銀濃度の増加に応じて、VTP2値が増加する一方、VCP2値は減少する。また、無機水銀濃度の増加に応じて、VCP1値は、低濃度においてはあまり変化しないが、高濃度においては増加する。また、図17により、Curve値は、高濃度になるにつれて経過時間1～2秒付近で時間分布がプラス側に変化することが判明した。

【0066】

また、図18及び図19は、遊離シアンを様々な濃度で含む水溶液サンプルを対象に算出された比較値を示すグラフである。図18において、(a)は、遊離シアン濃度に対するVCP1値の変化を示すグラフ、(b)は、遊離シアン濃度に対するVCP2値の変化を示すグラフ、(c)は、遊離シアン濃度に対するVTP2値の変化を示すグラフである。また、図19は、遊離シアン濃度を变化させた場合のCurve値を示すグラフである。遊離シアンは、光合成サンプルだけでなく一般的な細胞にも毒性を示す。なお図中に表記されている遊離シアン濃度は、シアン化カリウム溶液として調整し、最終的に合計3mlに調整された試験計測溶液中でのシアン化イオン換算の濃度である。

【0067】

図18に示すように、遊離シアン濃度の増加に応じて、VTP2値及びVCP2値は、低濃度においてはほとんど変化しないが、高濃度において減少する。また、有機シアン濃度の増加に応じて、VCP1値は、ほとんど変化しない。また、図19により、Curveは、高濃度になるにつれて時間分布がプラス側に变化し、その変化は、経過時間3~4秒付近に集中することが判明した。

【0068】

また、図20及び図21は、TPNを様々な濃度で含む水溶液サンプルを対象に算出された比較値を示すグラフである。図20において、(a)は、TPN濃度に対するVCP1値の変化を示すグラフ、(b)は、TPN濃度に対するVCP2値の変化を示すグラフ、(c)は、TPN濃度に対するVTP2値の変化を示すグラフである。また、図21は、TPN濃度を变化させた場合のCurve値を示すグラフである。TPNは殺菌作用を示す農薬等に含まれる成分で、細胞のエネルギーであるATP生産に関わる酵素を失活させる、光合成ではなく呼吸代謝に作用する化学物質である。なお、図中に表記されているTPN濃度は、TPNのみを主剤として含む殺菌剤を希釈して用い、最終的に合計3mlに調整された試験計測溶液中でのTPN濃度換算の濃度である。

【0069】

図20に示すように、TPN濃度の増加に応じて、VCP1値及びVTP2値は増加する一方、VCP2値は減少する。また、図21により、Curveは、高濃度になるにつれて時間分布が主にマイナス側に变化し、その変化は、経過時間2~5秒付近に集中することが判明した。その一方で、低濃度では、経過時間1~2秒付近でプラス側の变化も現れた。

【0070】

TPNは野菜における残留農薬の規制対象になっている殺菌剤の主要なもので、法定の規制濃度は1ppmとなっている。また、TPNを主剤とする主要な市販殺菌剤における散布濃度は400ppmである。本法における検出感度は、散布濃度の10000分の1程度の濃度で検出可能であり、野菜の表面から水溶液サンプルを得ることにより規制基準以下のTPNも十分に検出できることを示している。

【0071】

(生物生育阻害要因の解析・評価)

実際の水溶液サンプルの計測においては、その中に複数の生物生育阻害要因が同時に存在することがあり得る。生物生育阻害要因の評価方法により得られた遅延蛍光減衰カーブは、各種生育阻害要因による影響が時間的に分離されており、生物生育阻害要因に対して相加的に現れる。そのため、複数の生物生育阻害要因が存在した場合には、それぞれを別個に推定することが可能であると同時に、それら変化を積算して評価することも可能である。このように、生物生育阻害要因の定性的な評価と定量的な評価とが同時に行われる。

【0072】

水溶液サンプル中に異種の生物生育阻害要因が存在している場合、例えば、DCMUと無機水銀が存在している場合、本実施形態において用いている比較値の中での主たる変化の現れる比較値は、例えば、DCMUではVCP1値、無機水銀ではVCP2値及びVTP2値となっている。このように、遅延蛍光減衰カーブ中に変化が現れる比較値が異なる生物生育阻害要因を同時に含む場合、全体の比較値の変化は相加的に現れる。

【0 0 7 3】

図 2 2 は、生物生育阻害要因としての DCMU を濃度 0.1ppb で含有する試験計測溶液「DCMU」と、生物生育阻害要因としての水銀イオンを濃度 20ppb で含有する試験計測溶液「Hg²⁺」と、DCMU を濃度 0.1ppb 及び水銀イオンを濃度 20ppb で含有する試験計測溶液「DCMU+Hg」とのそれぞれから得られた比較値 VCP1 値、VCP2 値、及び VTP2 値を示している。図 2 2 において、(a) は、各試験計測溶液の VCP1 値を示すグラフ、(b) は、各試験計測溶液の VCP2 値を示すグラフ、(c) は、各試験計測溶液の VTP2 値を示すグラフである。

【0 0 7 4】

図 2 2 (a) で示されるように、VCP1 値では、主な変化の現れる評価値が VCP1 値である「DCMU」では 116.0、DCMU と水銀イオンを含む「DCMU+Hg」では、129.6、水銀イオンのみを含む「Hg²⁺」では、104.1 となっており、DCMU を含む場合には VCP1 値の変化が大きいことがわかる。また、図 2 2 (b) で示されるように、VCP2 値では、主な変化の現れる比較値が VCP2 値である「Hg²⁺」では 59.9、DCMU と水銀イオンを含む「DCMU+Hg」では、44.9、DCMU のみを含む「DCMU」では、88.0 となっており、水銀イオンを含む場合には、CP2 の変化が大きいことがわかる。また、図 2 2 (c) で示されるように、VTP2 値では、主な変化の現れる比較値が VTP2 値である「Hg²⁺」では 144.9、DCMU と水銀イオンを含む「DCMU+Hg」では、149.9、DCMU のみを含む「DCMU」では、100.0 となっており、水銀イオンを含む場合には、TP2 の変化が大きいことがわかる。

【0 0 7 5】

以上の結果から、DCMU と水銀イオンを含む「DCMU+Hg」では、DCMU での主な変化の現れる VCP1 値と水銀イオンでの主な変化の現れる比較値 VCP2 値及び VTP2 値に変化が現れており、DCMU と水銀イオンとを同時に含有している事が同時に計測可能であることがわかる。

【0 0 7 6】

一方、水溶液サンプル中に同種の生物生育阻害要因が存在している場合、例えば、アトラジンと DCMU とが存在している場合、本実施形態において用いている比較値の中での主たる変化の現れる比較値は、ともに VCP1 値となっている。このように、遅延蛍光減衰カーブ中に変化が現れる比較値が同じ生物生育阻害要因を同時に含む場合、全体の比較値の変化は相加的に現れる。

【0 0 7 7】

図 2 3 は、生物生育阻害要因としてのアトラジンを濃度 0.2ppb で含有する試験計測溶液「アトラジン」と、生物生育阻害要因としての DCMU を濃度 0.1ppb で含有する試験計測溶液「DCMU」と、DCMU を濃度 0.1ppb 及びアトラジンを濃度 0.2ppb で含有する試験計測溶液「アトラジン+DCMU」とのそれぞれから得られた比較値 VCP1 値、VCP2 値、及び VTP2 値を示している。図 2 3 において、(a) は、各試験計測溶液の VCP1 値を示すグラフ、(b) は、各試験計測溶液の VCP2 値を示すグラフ、(c) は、各試験計測溶液の VCP2 値を示すグラフである。

【0 0 7 8】

図 2 3 (a) で示されるように、VCP1 値は、「アトラジン」では 106.4、「DCMU」で 125.6、「アトラジン+DCMU」では、132.2 となっており、アトラジンと DCMU を同時に含む場合には CP1 が相加的に増加していることがわかる。また、図 2 3 (b) で示されるように、VCP2 値は、「アトラジン」では 90.0、「DCMU」で 84.6、「アトラジン+DCMU」では、86.0 となっており、大きな変化が見られないことがわかる。また、図 2 3 (c) で示されるように、VTP2 値は、「アトラジン」では 100.0、「DCMU」で 101.5、「アトラジン+DCMU」では、100.0 となっており、大きな変化が見られないことがわかる。

【0 0 7 9】

以上の結果から、アトラジンと DCMU を含む「アトラジン+DCMU」では、ともに主な変化の現れる比較値である VCP1 値において相加的に値が増加している。このように、同種の生物生育阻害要因は遅延蛍光の計測結果に相加的に影響を与えるので、同種の生物生育阻害要因となる化学物質に対する生物生育阻害要因の総合的な評価結果が得られる。

【0 0 8 0】

(生物生育阻害要因の評価用キット)

続いて、本発明による生物生育阻害要因の評価用キットについて詳細に説明する。上述した生物生育阻害要因の評価方法を簡便に実施するために、生物生育阻害要因の評価用キットを用いることができる。生物生育阻害要因の評価用キットは、水溶液サンプル又は標準サンプルに混合される濃縮化光合成サンプルと、光合成サンプルが混合された水溶液サンプル又は標準サンプルの塩濃度及びpHを調整するための濃縮された混合塩類、栄養塩類を含む調整溶液と、光合成サンプルと調整溶液とを水溶液サンプルに分離して混合させる混合手段と、を含むものである。

【0081】

なお、上記濃縮化光合成サンプル、調整溶液のいずれか、又はその両方には、光合成サンプルの空間的な安定化に必要な安定化剤を含むことが好ましい。なお、濃縮化光合成サンプルに安定化剤を含ませる場合には、濃縮状態で光合成サンプルに悪影響を与えないような安定化剤が用いられる。また、水溶液サンプル中の生育阻害要因に対して吸着や分解など、光合成サンプルへの作用を阻害しない安定化剤が好適に用いられる。安定化剤としては、例えば、アガロース等の多糖類や、高分子ポリマーが挙げられる。

【0082】

また、混合手段としては、採液容器中において光合成サンプルと調整溶液とを水溶液サンプルに分離して混合することができるものであれば任意の形状の採液容器を用いることができる。

【0083】

図24は、このような生物生育阻害要因の評価用キットを用いて遅延蛍光の計測を行う際の手順を示す図である。同図に示されるように、所定の採液容器50に所定量の水溶液サンプル52が採取され、その後、塩濃度及びpHが所定の範囲になるように調整溶液54が混合される。さらに、採液容器50に濃縮化光合成サンプル56が混ぜ合わされる。その後、採液容器50内で調製された試験計測溶液58を放置後、採液容器50を遅延蛍光計測装置1に収納させて遅延蛍光の光量の計測を行う。

【0084】

また、採液容器としては、吸引などにより所定量の水溶液サンプルが採取可能な注射筒やスポイトのような容器を採液容器として用いることも好ましい。この採液容器内に、どちらかまたは双方に安定化剤を含む調整溶液及び濃縮化光合成サンプルを分離した状態で収容しておくことも好ましい。この場合、水溶液サンプル採取の際の一挙動で調整溶液、光合成サンプル、安定化剤の混合が可能であるため計測をより簡便に行うことができる。また、水溶液サンプルが吸引された場合に、先に調整溶液と混合され、次に濃縮化光合成サンプルと混合されるような位置に、調整溶液及び濃縮化光合成サンプルが保持されていることがより好ましい。これにより、水溶液サンプルの塩濃度、pHが光合成サンプルに影響を与えうる範囲であっても、調整溶液で調整後に光合成サンプルを混合することにより光合成サンプルに対する影響を低減することができる。

【0085】

図25は、スポイト型の生物生育阻害要因の評価用キットを用いて遅延蛍光の計測を行う際の手順を示す図である。同図に示されるように、スポイト型の採液容器60内には、調整溶液54と濃縮化光合成サンプル56とが上下に分離して収容されている。採液容器60中で、調整溶液と濃縮化光合成サンプルを分離して保持するために、採液容器60自体に壁や溶液ポケット等の分離手段が備えられていても良い。また、採液容器60の構造の単純化、コストの低減化の観点からは、調整溶液と濃縮化光合成サンプルそれぞれに濃縮されたゲル化剤などの安定化剤が含まれていることにより、それぞれもしくは片方の溶液が高粘性を持っていたりしても良い。このような採液容器60において、調整溶液54が収容されている位置まで水溶液サンプル52が吸引採取され、水溶液サンプルと調整溶液54とが一旦混合される。その後、採液容器60に水溶液サンプル52が所定量に達するまで吸引採取され、濃縮化光合成サンプル56と混ぜ合わされる。このようにして採液容器60内で調製された試験計測溶液を放置後、採液容器60を遅延蛍光計測装置1に収納させ

て遅延蛍光の光量の計測を行う。

【0086】

以上説明した生物生育阻害要因の評価用キットを用いることにより、水溶液サンプルに対して高濃度の塩類を含む調整溶液と光合成サンプルとが別々に混合されるので、塩類の光合成サンプルに対する影響を最小限化して、浸透圧差などによる光合成サンプルの死亡・破損を防止することができる。

【0087】

以下、本発明の実施形態にかかる生物生育阻害要因の評価方法の作用効果について説明する。

【0088】

生物生育阻害要因の評価方法によれば、評価対象の水溶液サンプルに混合された光合成サンプルから発せられる遅延蛍光の減衰カーブと、生物生育阻害要件の存在しない溶液中の光合成サンプルから発せられる遅延蛍光の減衰カーブとが計測される。そして、それぞれの減衰カーブから、ピークや変曲点等の特徴点を評価し、両者を比較することにより生物生育阻害要因の光合成サンプルに対する影響が評価される。そのような評価を行うことにより、複数の化学物質を同時に、かつ精度良く定性、定量することができる。また、遅延蛍光の光量を計測して評価することにより、計測時間を全体的に短縮化することができる。

【0089】

なお、本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、例えば、本実施形態にかかる生物生育阻害要因の評価方法では、計測溶液の放置時の光条件は所定の条件に制御されていたが、これは、計測溶液の計測毎に光条件を様々変化させて比較値を評価するようにしても良い。

【0090】

図26は、この場合の生物生育阻害要因の評価方法の手順を示すフローチャートである。図3における手順との相違点を中心に説明すると、まず、ステップS01、ステップS02及びステップS05、ステップS06と同様にして、試験計測溶液及び標準計測溶液が調製される（ステップS21～ステップS22，ステップS26～ステップS27）。そして、初回の放置時の光条件が設定される（ステップS23、ステップS28）。その後、設定された光条件のもとで試験計測溶液及び標準計測溶液を所定の放置時間放置する（ステップS24、ステップS29）。その後、図3におけるステップS04、ステップS08～S12と同様にして計測された遅延蛍光の光量から比較値が算出され、その比較値が評価される（ステップS25、ステップS30～ステップS34）。そして評価が終了すると、ステップS23及びステップS28に戻って、前回設定した光条件を変化させた後、再度比較値を算出し、光条件に応じた比較値の変化の評価を繰り返し行う。なお、計測溶液は、各光条件毎に新しく調製してもよい。

【0091】

また、放置時における光条件としては、生物生育阻害要因の変化をより細かく計測するために、可視光領域の単色光またはその組み合わせ、赤外光や紫外光などの光を単独又は組み合わせて用いることが可能である。

【0092】

図27は、放置時の光条件を様々変えて算出された比較値の一例を示すグラフである。図27において、(a)は、様々な光条件に対するTPNに関する比較値、(b)は、様々な光条件に対する無機水銀に関する比較値を示すグラフである。ここで、放置時の光条件は、計測溶液に対する照射光を、白色蛍光灯、緑色単色光（波長530nm）、及び赤色単色光（波長665nm）の3種類に変化させ、各照射光の光量を $1.5\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ に設定した。比較値としてはVCP1値、VCP2値、VTP2値を算出した。

【0093】

図27(a)に示されるように、TPNの場合、VTP2値は、放置時の光条件が「白色光」

の場合122、「緑色光」の場合89、「赤色光」の場合118、となる。VCP2値は、放置時の光条件が「白色光」の場合47、「緑色光」の場合78、「赤色光」の場合44、となる。VCP1値は、放置時の光条件が「白色光」の場合144、「緑色光」の場合112、「赤色光」の場合、171となる。この結果から、TPNの場合、放置時の光条件が「緑色光」の場合はVCP1、VCP2、VTP2の全ての評価値の変化率が低下し、生物生育阻害要因の検出感度が低下することがわかる。

【0094】

また、図27(b)に示されるように、無機水銀の場合、VTP2値は、放置時の光条件が「白色光」の場合117、「緑色光」の場合113、「赤色光」の場合114、となる。VCP2値は、放置時の光条件が「白色光」の場合77、「緑色光」の場合78、「赤色光」の場合77、となる。VCP1値は、放置時の光条件が「白色光」の場合103、「緑色光」の場合96、「赤色光」の場合98、となる。このため無機水銀の場合、放置時の光条件による、CP1、CP2、TP2の評価値の変化率に大きな差がないことがわかる。

【0095】

上記結果より、水溶液サンプル中の生物生育阻害要因の作用は、放置条件での光条件により変化するが、この変化は生物生育阻害要因毎に異なり、特定の光波長条件で影響が増大するものや、光条件による影響を受けない生物生育阻害要因などがあることが理解できる。

【0096】

従って、光条件を様々変化させて比較値を評価することにより、同一の水溶液サンプルから得られる試験計測溶液を異なる光条件に置いて、それらの計測結果を比較して、生物生育阻害要因の定性に関する情報を得ることができる。例えば、図27(a)において示されるように、TPNの場合、白色光および赤色光における場合と比較して、緑色光においてVCP1、VCP2、及びVTP2の変化が減少する。このことに着目して、他の生物生育阻害要因との判別が可能である。

【実施例】

【0097】

以下、本発明の好適な実施例についてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0098】

(実施例1)

評価対象の水溶液サンプルとして井戸水、湖沼水から得た水溶液、標準サンプルとして蒸留水を用い、上述した標準的な測定条件のもとでの、比較値を算出した。図28には、本実施例における比較値の算出結果を示す。図28において、(a)は、井戸水及び湖沼水を対象に算出されたVCP1値、(b)は、同様に算出されたVCP2値、(c)は、同様に算出されたVTP2値を示すグラフである。

【0099】

図28に示されるように、「井戸水」において、VCP1値が137.1%と増加したが、「湖沼水」では顕著な変化が認められなかった。また、VCP2値及びVTP2値に顕著な変化は認められなかった。さらに、同一地点の井戸水について12日間に4回採水し計測を行った結果、ほぼ同様に120~140%程度のVCP1値が得られた。

【0100】

本実施例の結果において、VCP1値のみが120~140%程度となる生物生育阻害要因として考えられる既知の化学物質は、0.5ppb以下の極低濃度レベルのDCMU、アトラジンなどの疎水性除草剤である。従って、試験に用いた井戸水には、DCMUまたはアトラジンに類する疎水性化学物質系の農薬が含まれていると推測された。

【0101】

(実施例2)

評価対象の水溶液サンプルとして、実施例1における井戸水及び蒸留水、0.1ppb濃度のDCMUを含む水溶液について、標準的な測定条件のもとで、実施例1と同様にして比較値を

算出した。DCMUは、既知の疎水性有機物系除草剤の一つであり、実施例1における井戸水と評価値の変化の特徴が似ているものである。

【0102】

また、井戸水、蒸留水、及びDCMUの各水溶液を吸着処理し、吸着処理された水溶液を対象にVCP1値を算出することも行った。吸着には、高密度フィルタ濾過水（Millipore社milli-Qにより濾過された水）により洗浄した後に乾燥させた活性炭を用いた。そして、蒸留水、井戸水、0.1ppb濃度DCMUのそれぞれの水溶液5mlに対し0.8gの活性炭を加えた後、1時間緩やかに浸透した。この3種の溶液をそれぞれ、0.45 μ mのフィルタに濾過させて得られたものを対象に遅延蛍光量の測定を行った。

【0103】

図29には、本実施例におけるVCP1値の算出結果を示す。図29においては、蒸留水、井戸水、DCMUの各水溶液サンプルについて算出されたVCP1値と、吸着処理されたそれぞれの各水溶液サンプルについて算出されたVCP1値を示す。図29に示されるように、VCP1値は、蒸留水から得られた結果に対し、「井戸水」で117.1、「DCMU」で120.9となり、井戸水から得られたCP1の変化は、0.1ppb濃度のDCMUにおける変化とほぼ同一の結果となった。

【0104】

また、吸着前の蒸留水「蒸留水」のVCP1値100に対する、活性炭吸着処理の後の蒸留水「蒸留水（吸着後）」のVCP1値は、99.7となり、活性炭吸着処理のVCP1の変化に対する影響はほとんど無いと評価された。活性炭吸着処理前にVCP1の増加が見られた「井戸水」と「DCMU」では、活性炭吸着処理後のそれぞれのVCP1値が、「井戸水（吸着後）」で95.5、「DCMU（吸着後）」で96.3となり、「蒸留水」および「蒸留水（吸着後）」と同等の値となった。この結果より、この井戸水にはDCMUなど疎水性有機物に類する物質が含まれているということが評価された。

【図面の簡単な説明】

【0105】

【図1】 遅延蛍光計測装置の一実施形態を示す図である。

【図2】 図1の遅延蛍光計測装置を部分的に示すブロック図である。

【図3】 本発明の実施形態にかかる生物生育阻害要因の評価方法の手順を示すフローチャートである。

【図4】 遅延蛍光の光量を測定する際の遅延蛍光計測装置1の動作を示すフローチャートである。

【図5】 遅延蛍光の光量の時間的変化の一例を示す図である。

【図6】 (a)は、波長665nmの吸光度と遅延蛍光量との関係の一例を示すグラフ、(b)は、波長750nmの吸光度と遅延蛍光量との関係の一例を示すグラフである。

【図7】 吸光度に対する比較値VCP1の変化を示すグラフである。

【図8】 (a)は、光強度を変化させた場合の評価値CP1を示すグラフ、(b)は、光強度を変化させた場合の評価値CP2を示すグラフ、(c)は、光強度を変化させた場合の評価値TP2を示すグラフである。

【図9】 (a)は、光波長を変化させた場合の評価値CP1を示すグラフ、(b)は、光波長を変化させた場合の評価値CP2を示すグラフ、(c)は、光波長を変化させた場合の評価値TP2を示すグラフである。

【図10】 (a)は、アトラジン濃度に対する比較値VCP1の変化を示すグラフ、(b)は、アトラジン濃度に対する比較値VCP2の変化を示すグラフ、(c)は、アトラジン濃度に対する比較値VTP2の変化を示すグラフである。

【図11】 アトラジン濃度を変化させた場合のCurve値を示すグラフである。

【図12】 (a)は、DCMU濃度に対する比較値VCP1の変化を示すグラフ、(b)は、DCMU濃度に対する比較値VCP2の変化を示すグラフ、(c)は、DCMU濃度に対する比較値VTP2の変化を示すグラフである。

【図13】 DCMU濃度を変化させた場合のCurve値を示すグラフである。

【図 1 4】 (a) は、パラコート濃度に対する比較値 V C P 1 の変化を示すグラフ、(b) は、パラコート濃度に対する比較値 V C P 2 の変化を示すグラフ、(c) は、パラコート濃度に対する比較値 V T P 2 の変化を示すグラフである。

【図 1 5】 パラコート濃度を变化させた場合の Curve 値を示すグラフである。

【図 1 6】 (a) は、無機水銀濃度に対する比較値 V C P 1 の変化を示すグラフ、(b) は、無機水銀濃度に対する比較値 V C P 2 の変化を示すグラフ、(c) は、無機水銀濃度に対する比較値 V T P 2 の変化を示すグラフである。

【図 1 7】 無機水銀濃度を变化させた場合の Curve 値を示すグラフである。

【図 1 8】 (a) は、遊離シアン濃度に対する比較値 V C P 1 の変化を示すグラフ、(b) は、遊離シアン濃度に対する比較値 V C P 2 の変化を示すグラフ、(c) は、遊離シアン濃度に対する比較値 V T P 2 の変化を示すグラフである。

【図 1 9】 遊離シアン濃度を变化させた場合の Curve 値を示すグラフである。

【図 2 0】 (a) は、TPN 濃度に対する比較値 V C P 1 の変化を示すグラフ、(b) は、TPN 濃度に対する比較値 V C P 2 の変化を示すグラフ、(c) は、TPN 濃度に対する比較値 V T P 2 の変化を示すグラフである。

【図 2 1】 TPN 濃度を变化させた場合の Curve 値を示すグラフである。

【図 2 2】 (a) は、異種の生物生育阻害要因を含む各試験計測溶液の比較値 V C P 1 を示すグラフ、(b) は、異種の生物生育阻害要因を含む各試験計測溶液の比較値 V C P 2 を示すグラフ、(c) は、異種の生物生育阻害要因を含む各試験計測溶液の比較値 V T P 2 を示すグラフである。

【図 2 3】 (a) は、同種の生物生育阻害要因を含む各試験計測溶液の比較値 V C P 1 を示すグラフ、(b) は、同種の生物生育阻害要因を含む各試験計測溶液の比較値 V C P 2 を示すグラフ、(c) は、同種の生物生育阻害要因を含む各試験計測溶液の比較値 V T P 2 を示すグラフである。

【図 2 4】 本発明の一実施形態にかかる生物生育阻害要因の評価用キットを用いて遅延蛍光の計測を行う際の手順を示す図である。

【図 2 5】 本発明の他の実施形態にかかる生物生育阻害要因の評価用キットを用いて遅延蛍光の計測を行う際の手順を示す図である。

【図 2 6】 本発明の他の実施形態にかかる生物生育阻害要因の評価方法の手順を示すフローチャートである。

【図 2 7】 (a) は、放置時の様々な光条件に対する TPN に関する比較値を示すグラフ、(b) は、放置時の様々な光条件に対する無機水銀に関する比較値を示すグラフである。

【図 2 8】 (a) は、実施例 1 において算出された比較値 V C P 1 を示すグラフ、(b) は、実施例 1 において算出された比較値 V C P 2 を示すグラフ、(c) は、実施例 1 において算出された比較値 V T P 2 を示すグラフである。

【図 2 9】 実施例 2 において算出された比較値 V C P 1 を示すグラフである。

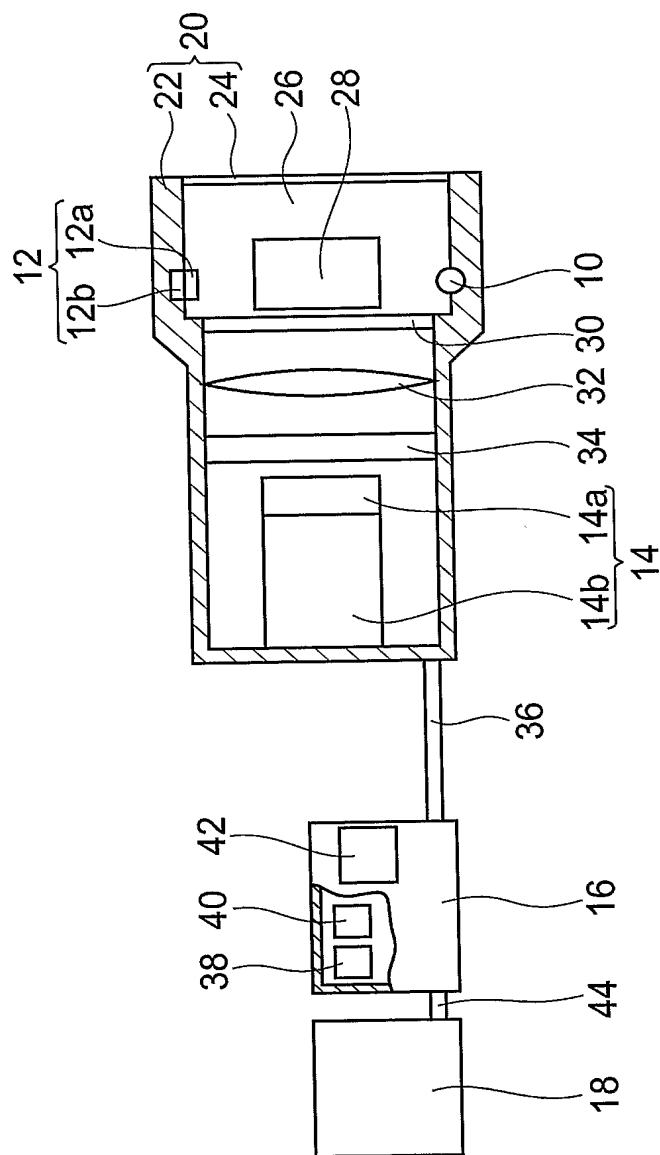
【符号の説明】

【0 1 0 6】

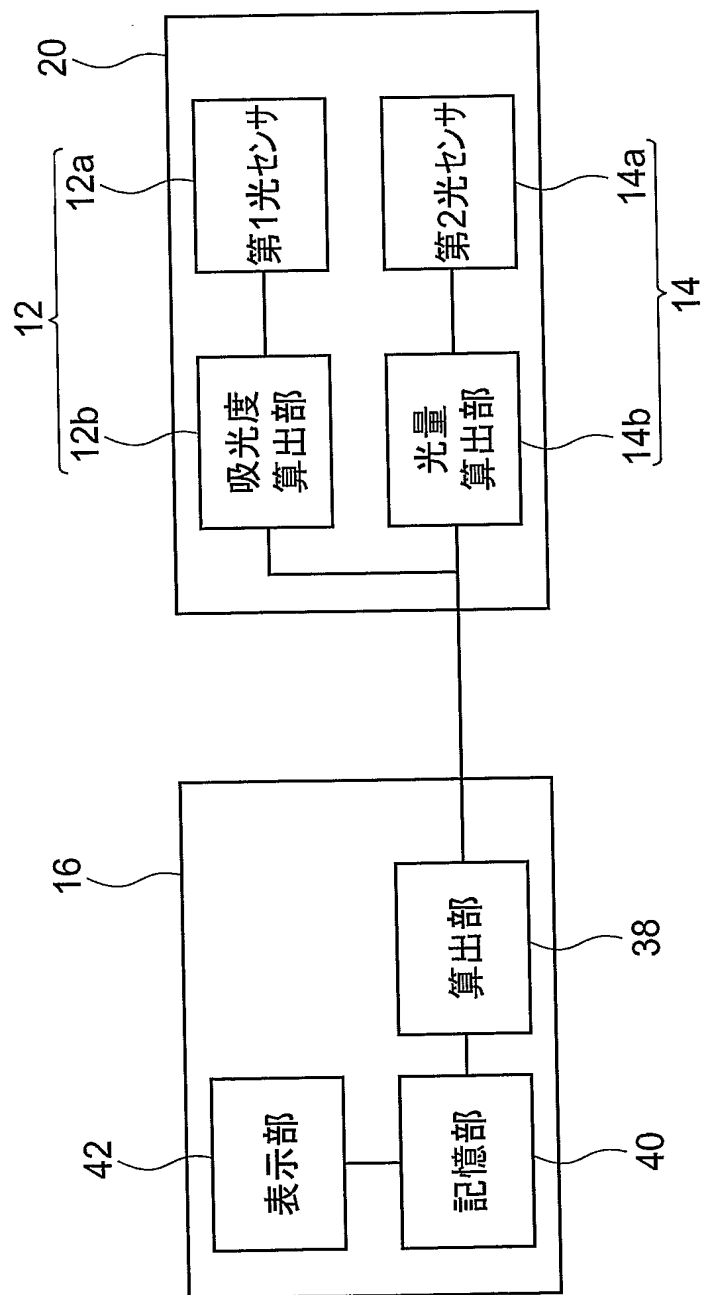
1 … 遅延蛍光計測装置、1 0 … 光源、1 2 … 第 1 測定部、1 2 a … 第 1 光センサ、1 2 b … 散乱光量算出部、1 4 … 測定部、1 4 a … 第 2 光センサ、1 4 b … 遅延蛍光量算出部、1 6 … 解析部、1 8 … 制御部、2 0 … 筐体、2 2 … 本体部、2 4 … 蓋部、2 6 … 導入口、2 8 … 設置部、3 0 … フィルタ、3 2 … 集光光学系、3 4 … シャッタ、3 6, 4 4 … ケーブル、3 8 … 算出部、4 0 … 記憶部、4 2 … 表示部、5 0 … 採液容器、5 2 … 水溶液サンプル、5 4 … 調整溶液、5 6 … 濃縮化光合成サンプル、5 8 … 試験計測溶液、6 0 … 採液容器。

【書類名】 図面
【図 1】

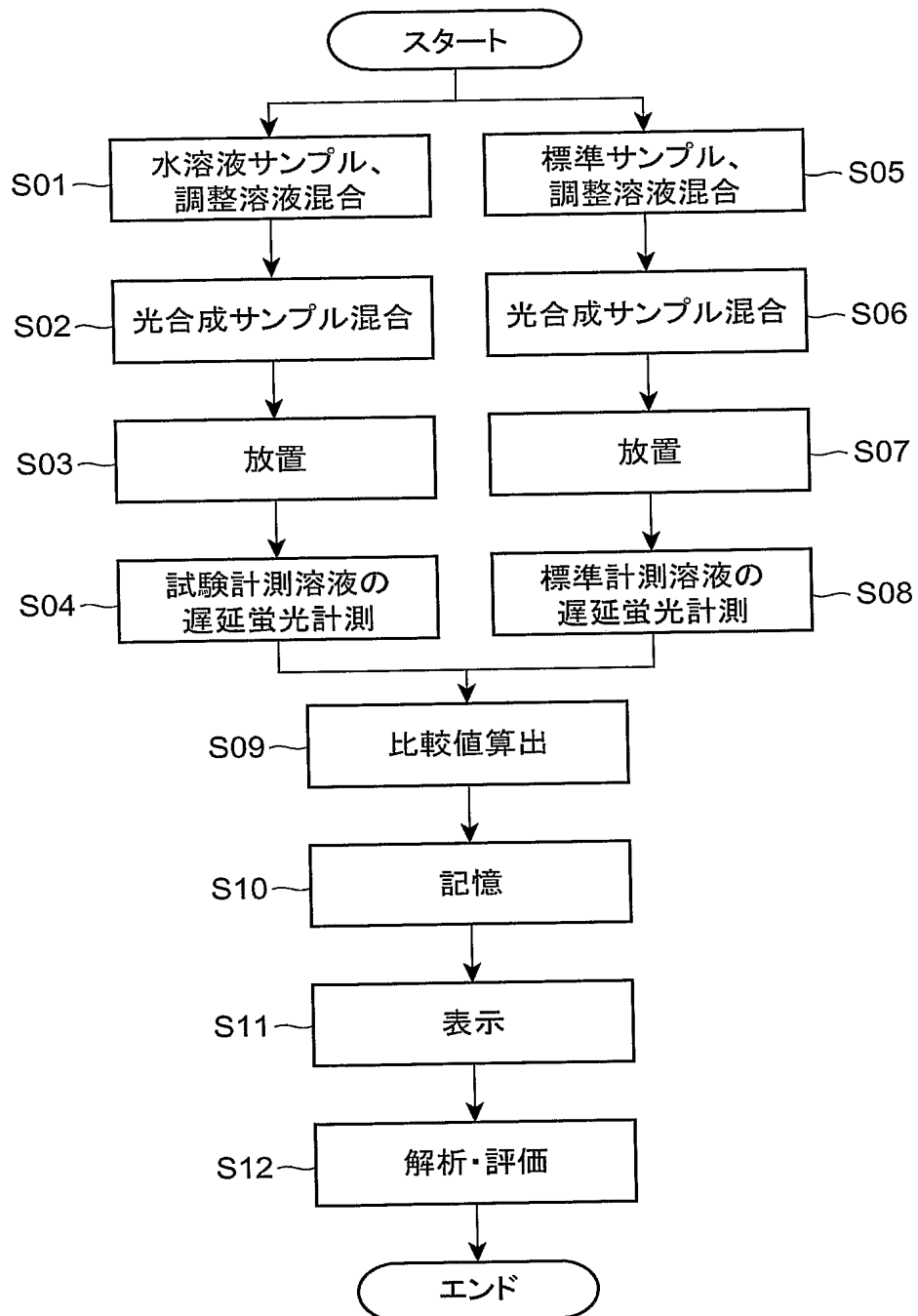
1



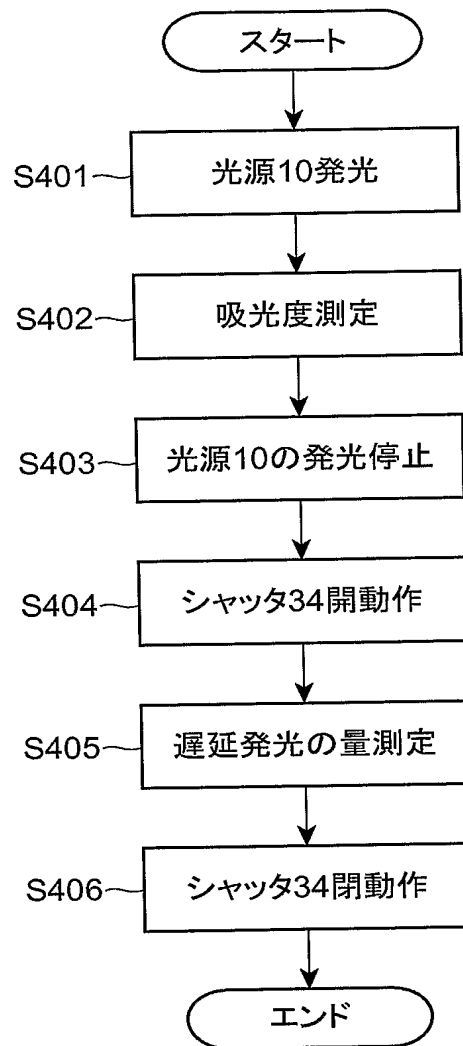
【図 2】



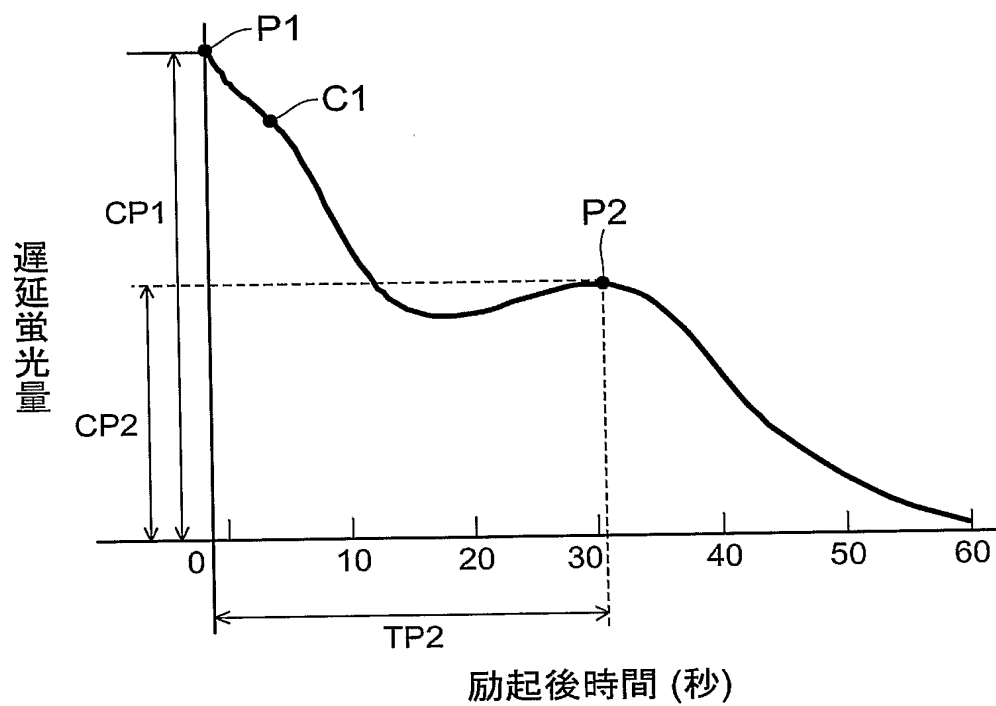
【図 3】



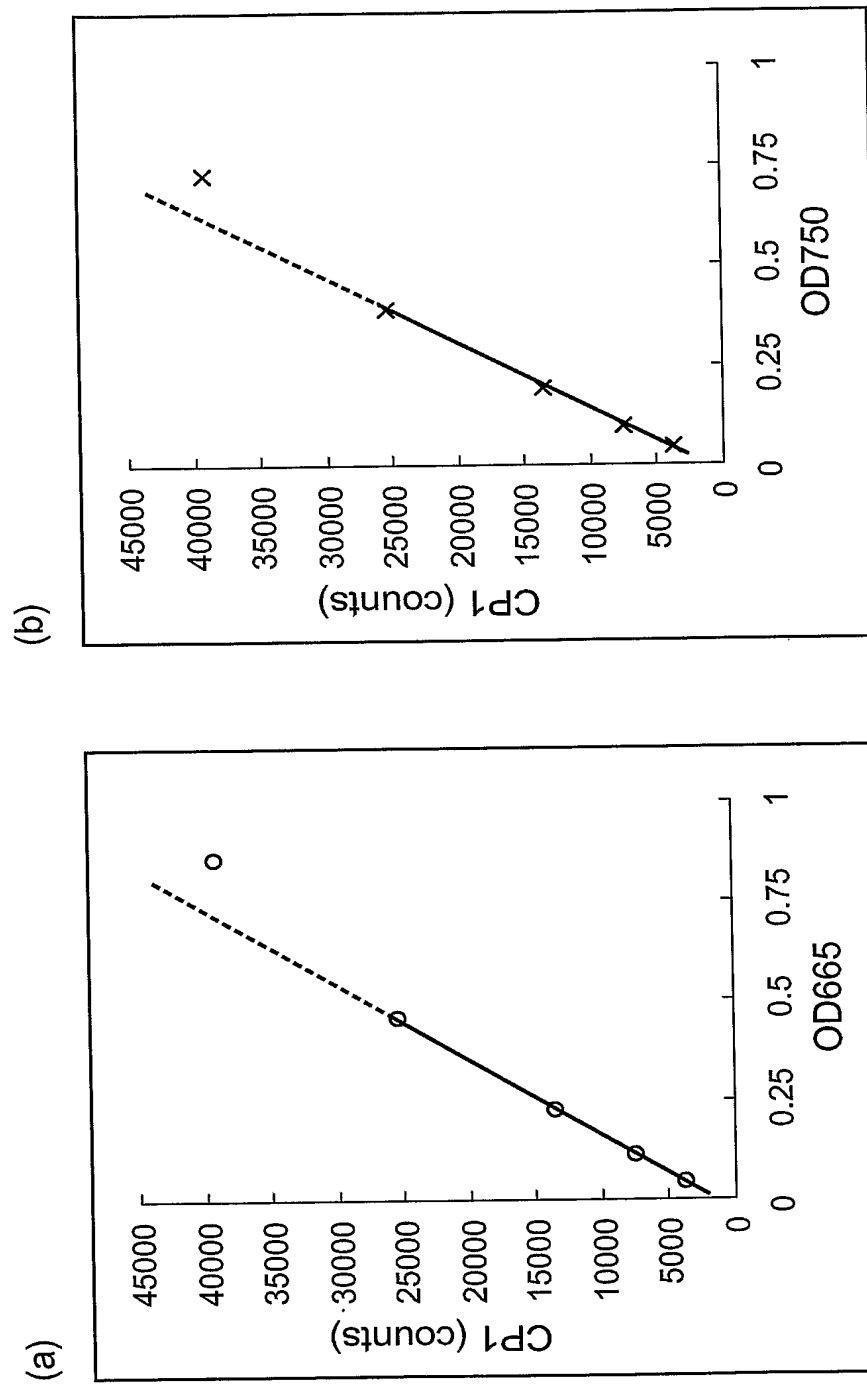
【図 4】



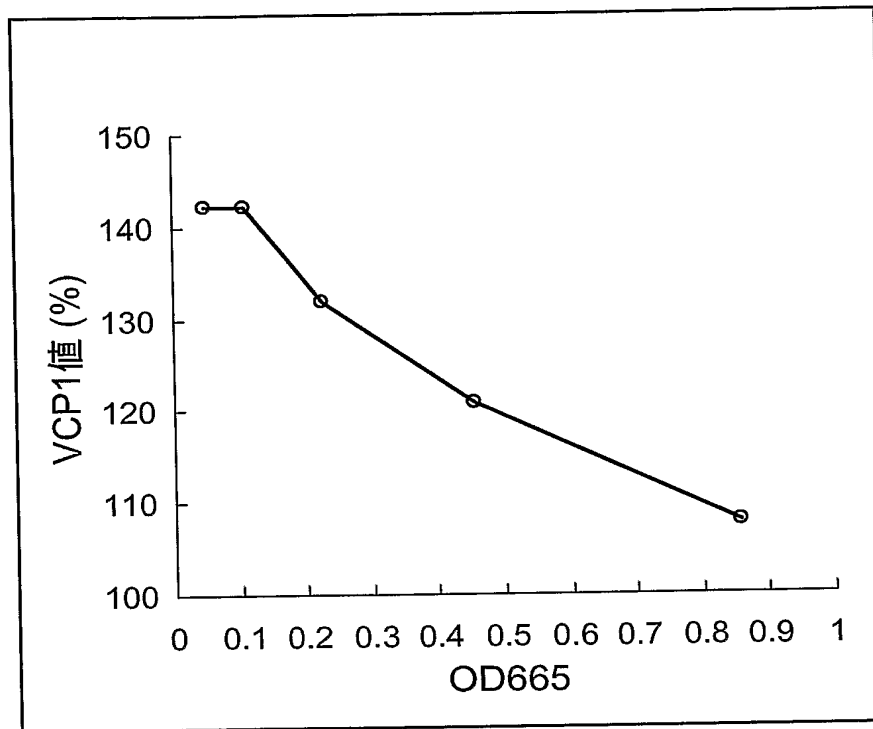
【図 5】



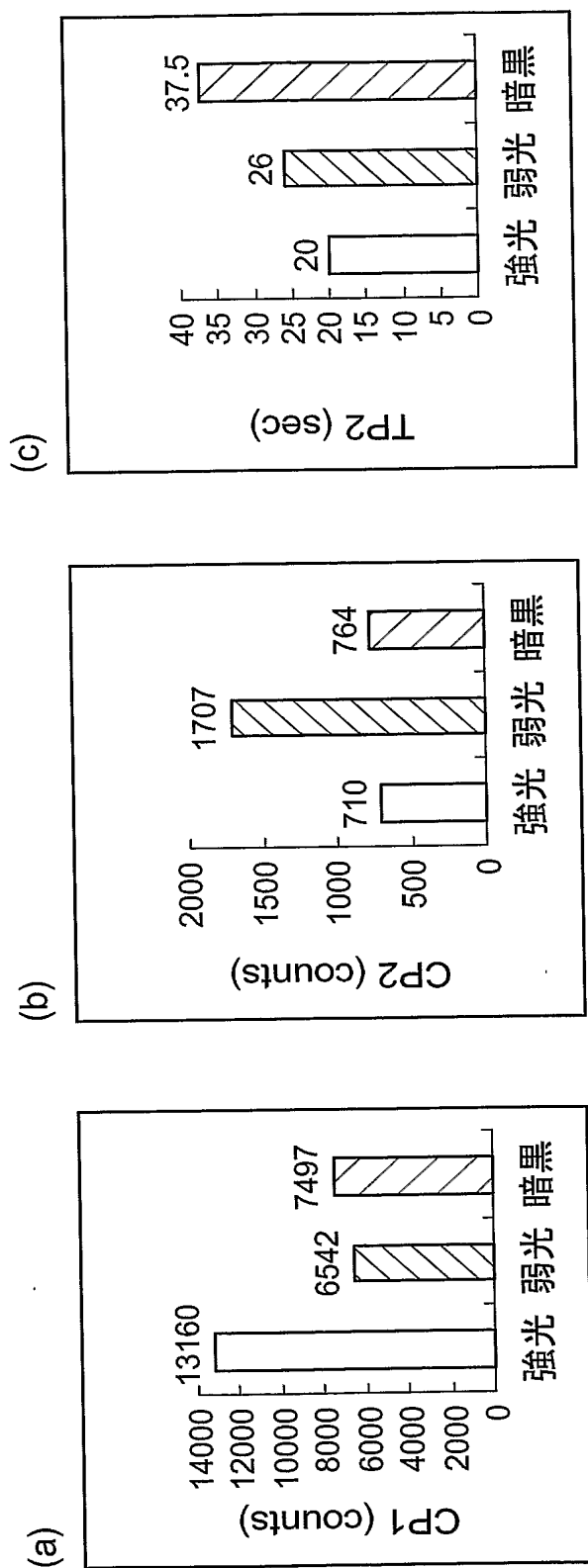
【図 6】



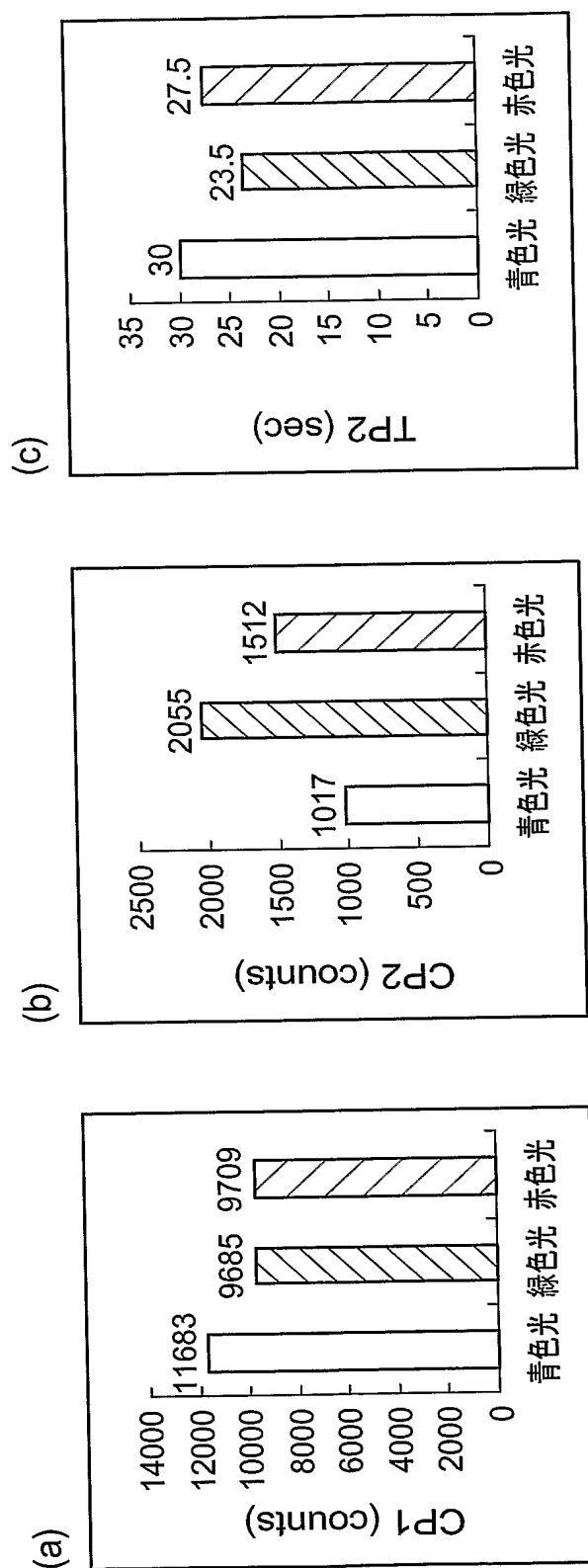
【図 7】



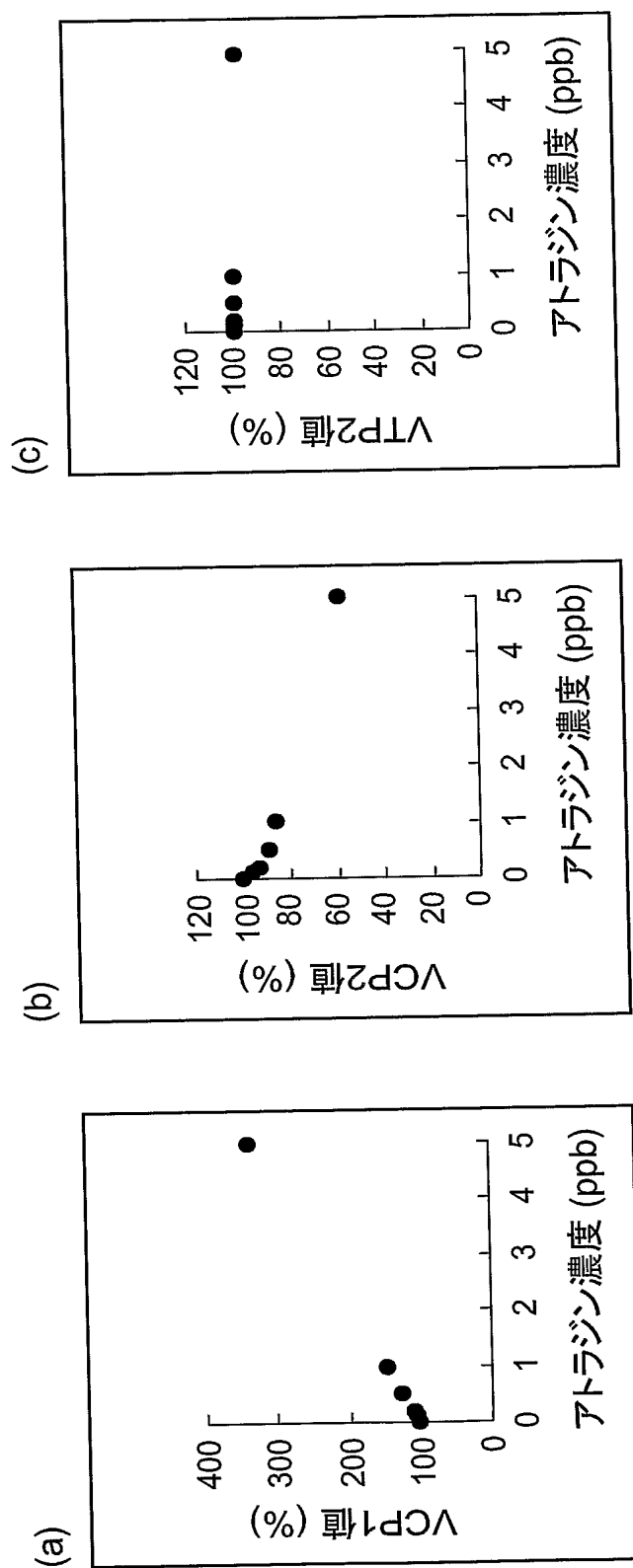
【図 8】



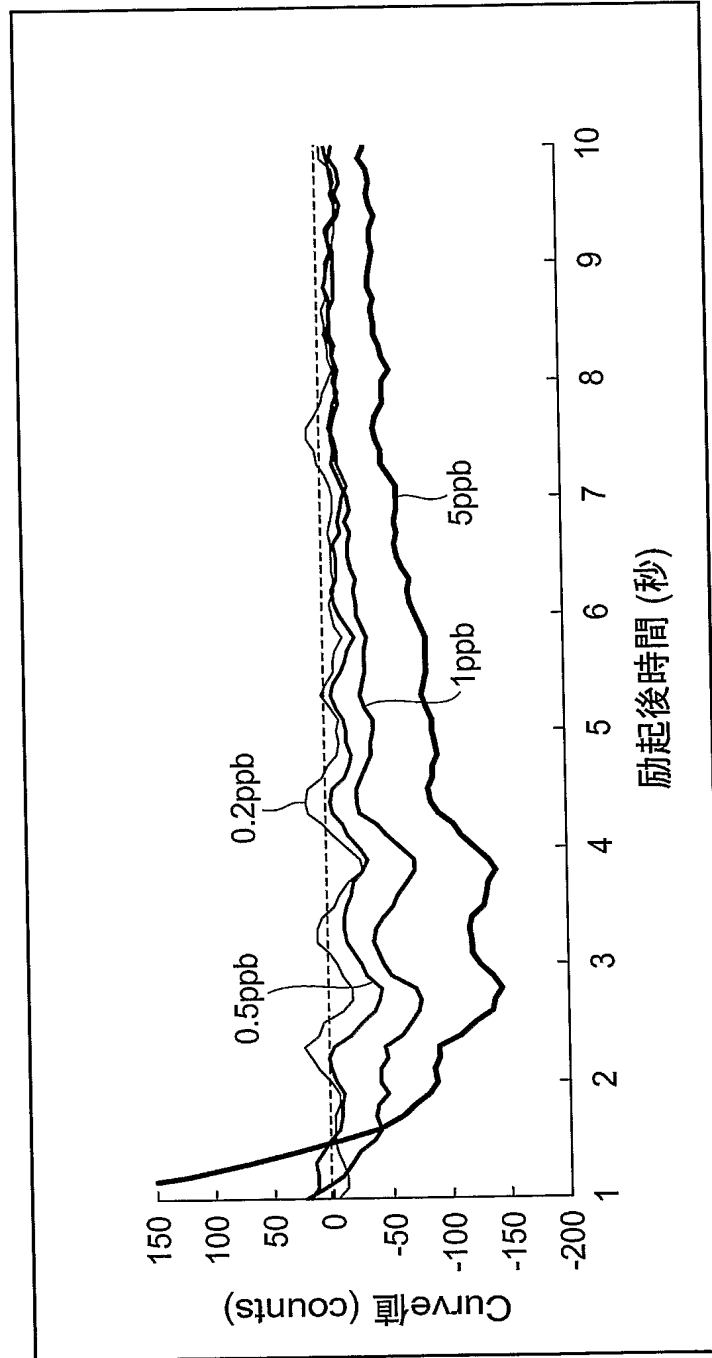
【図 9】



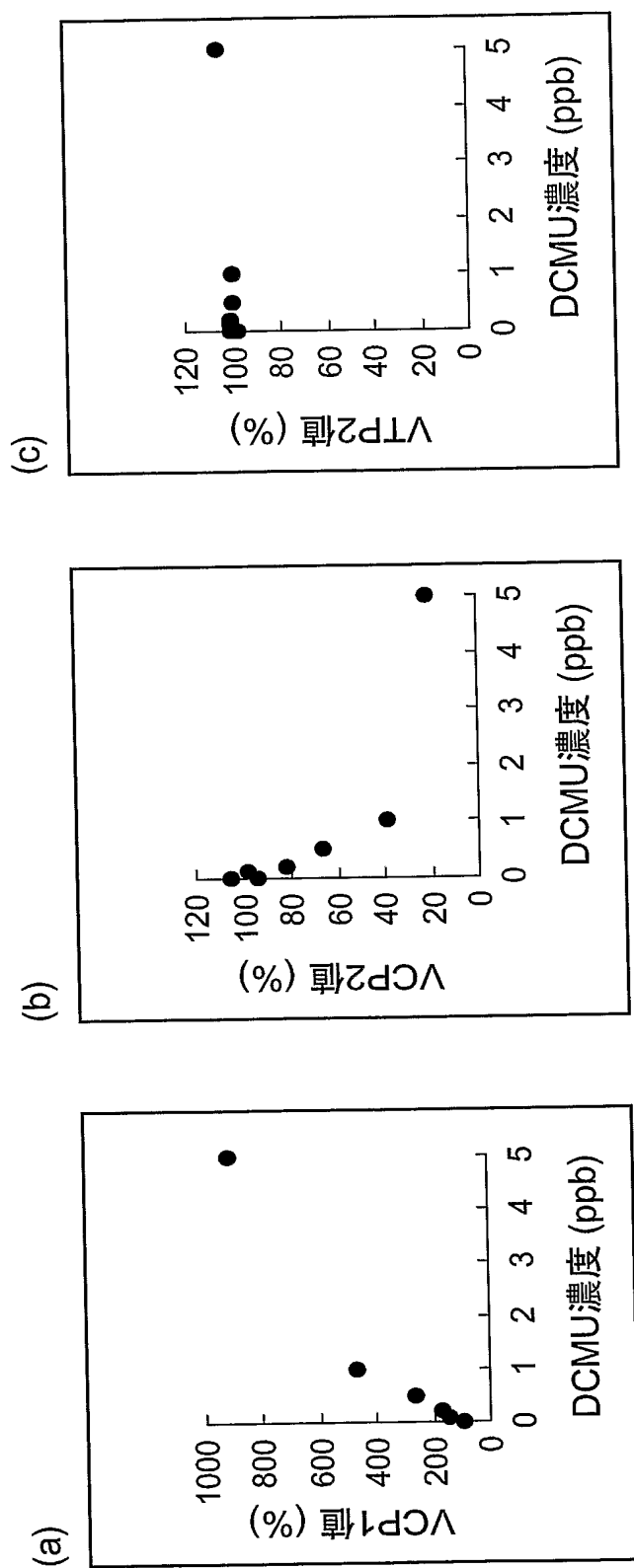
【図 10】



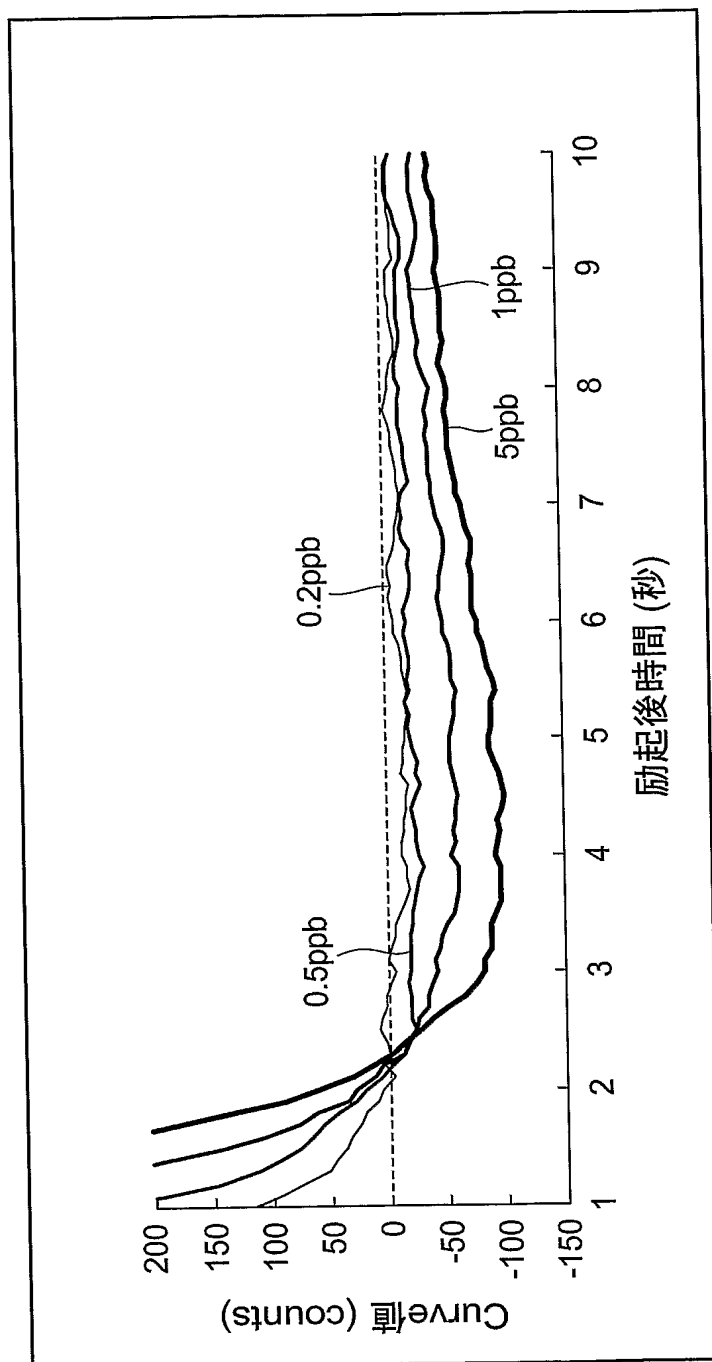
【図 11】



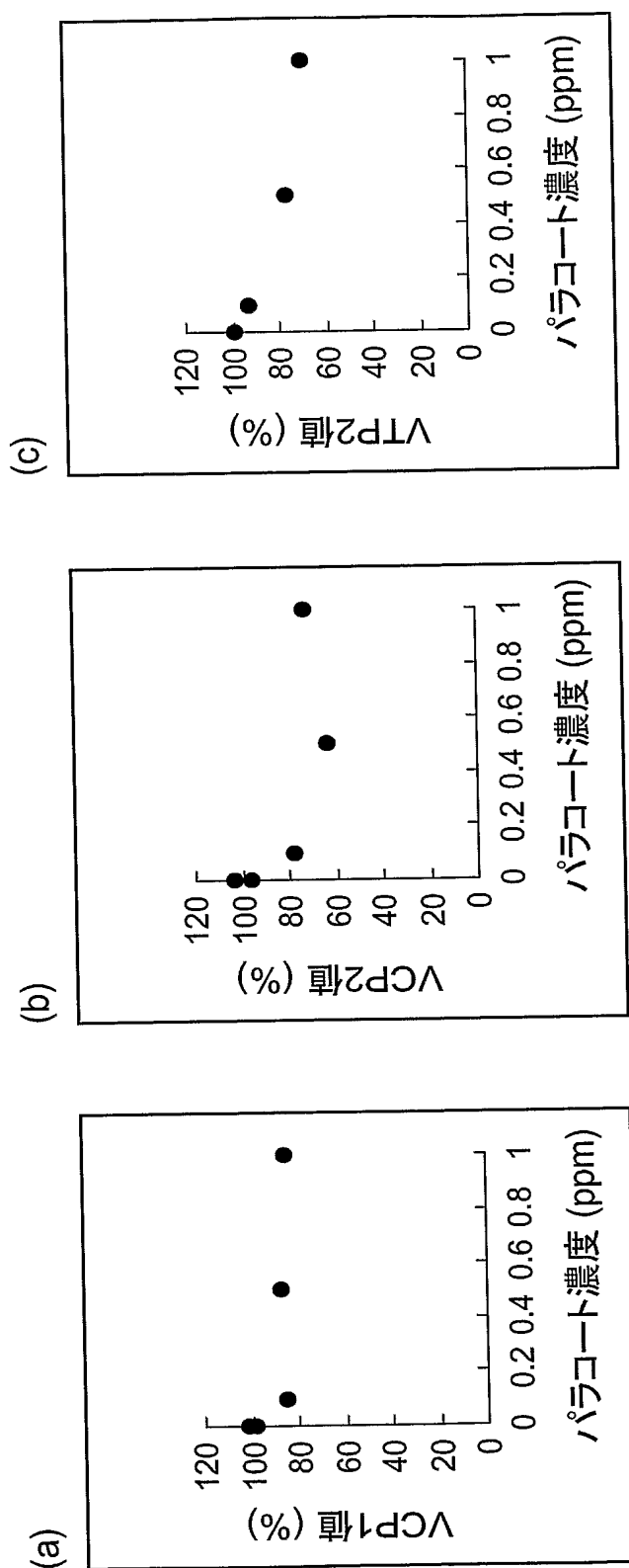
【図 12】



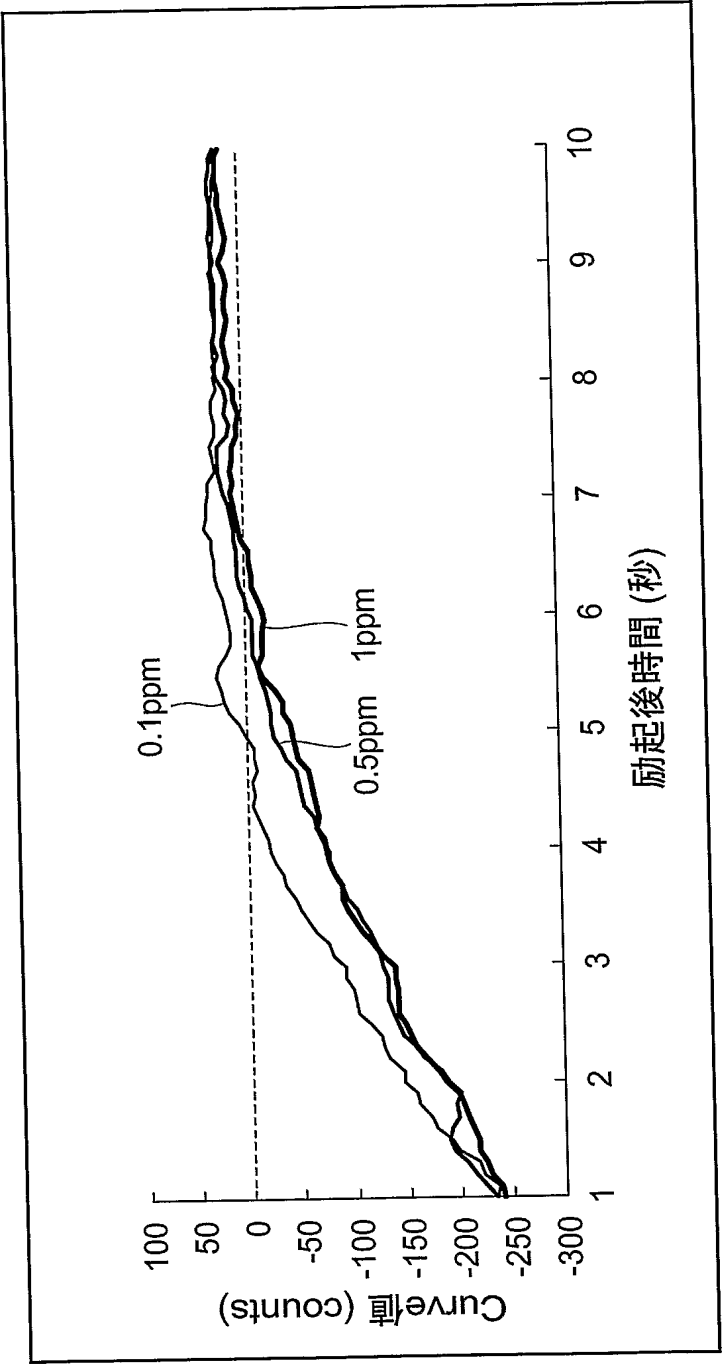
【図 13】



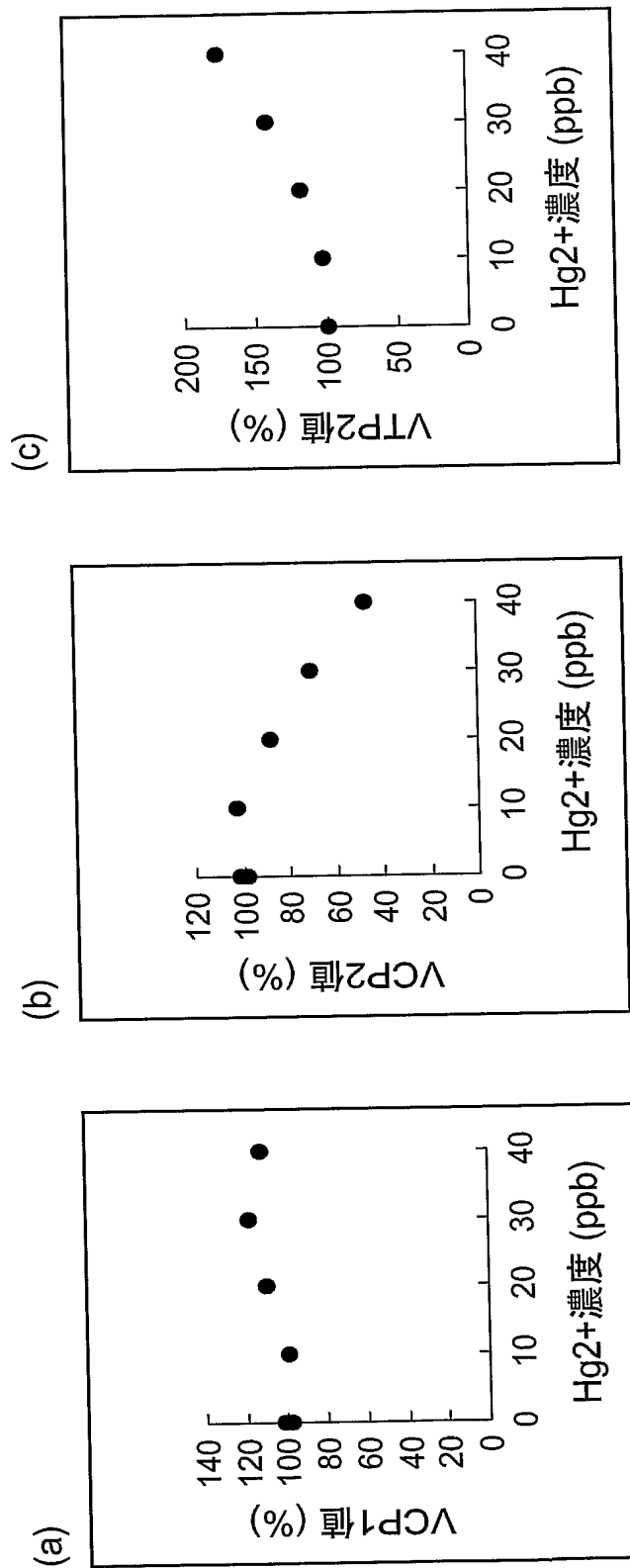
【図 14】



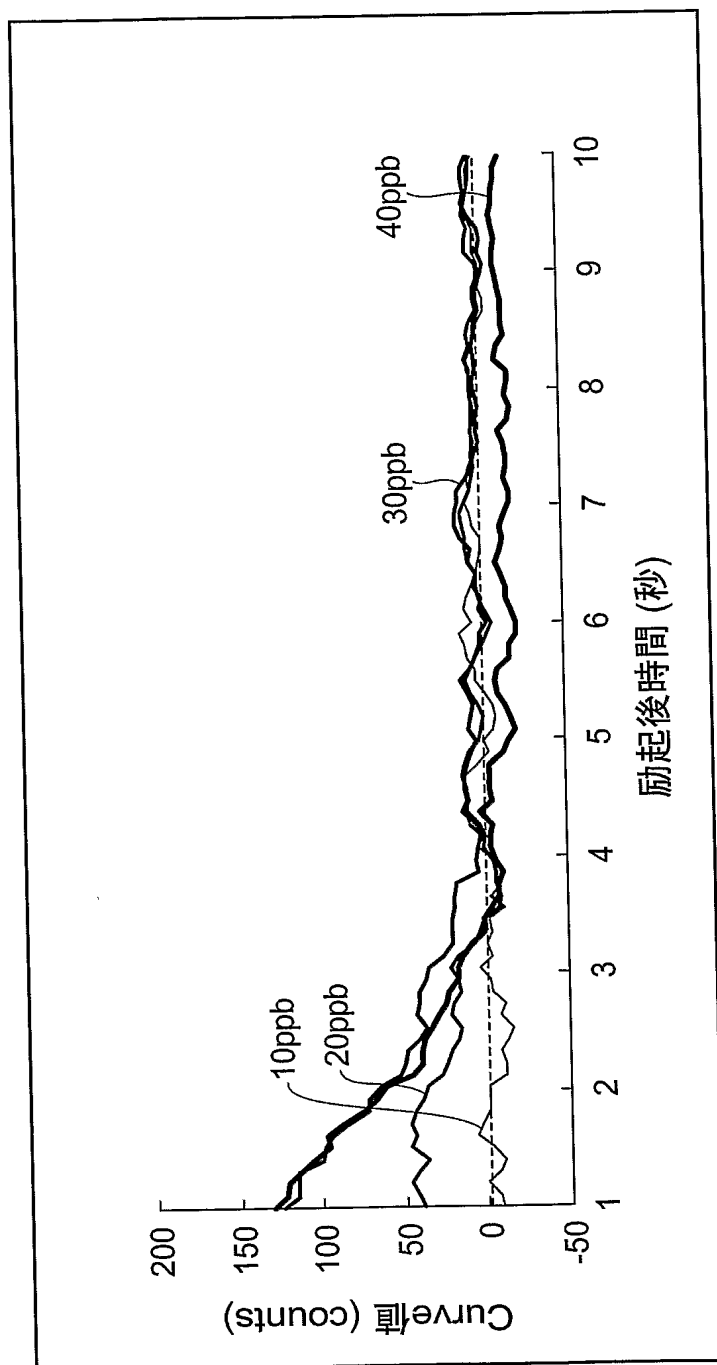
【図 15】



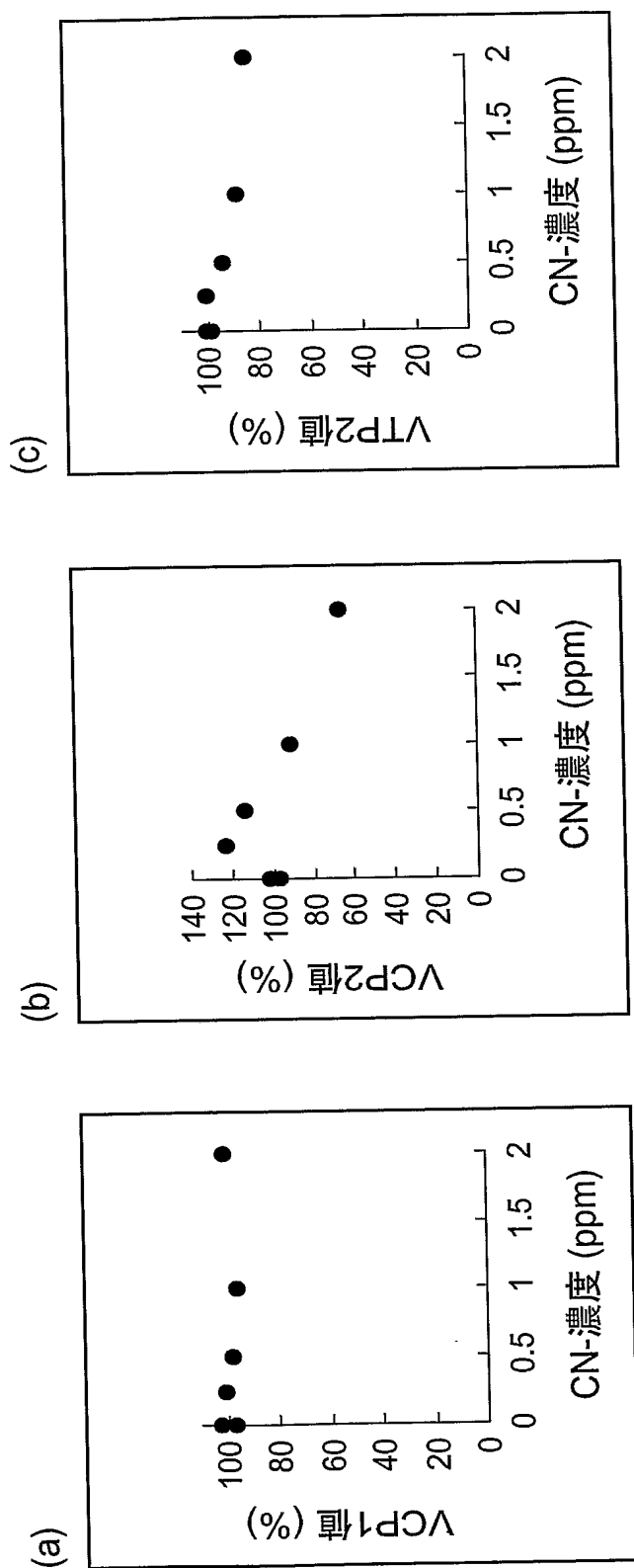
【図 16】



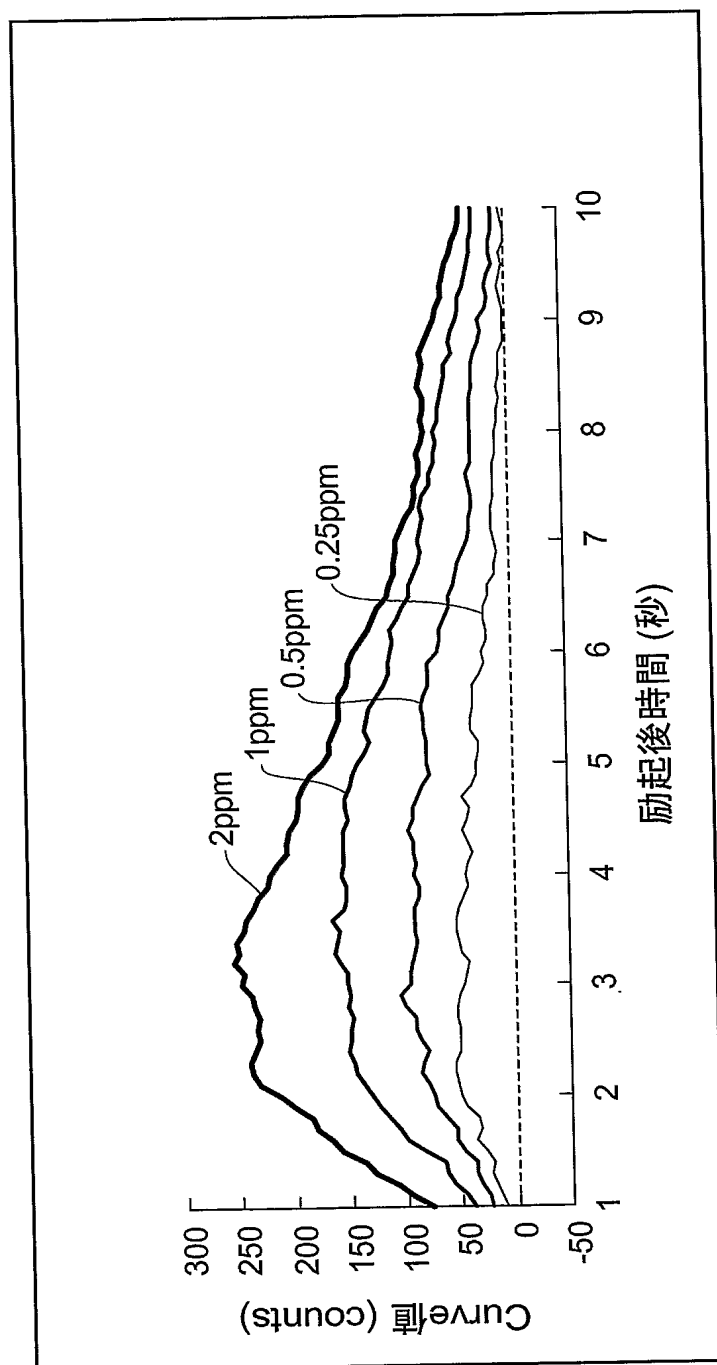
【図 17】



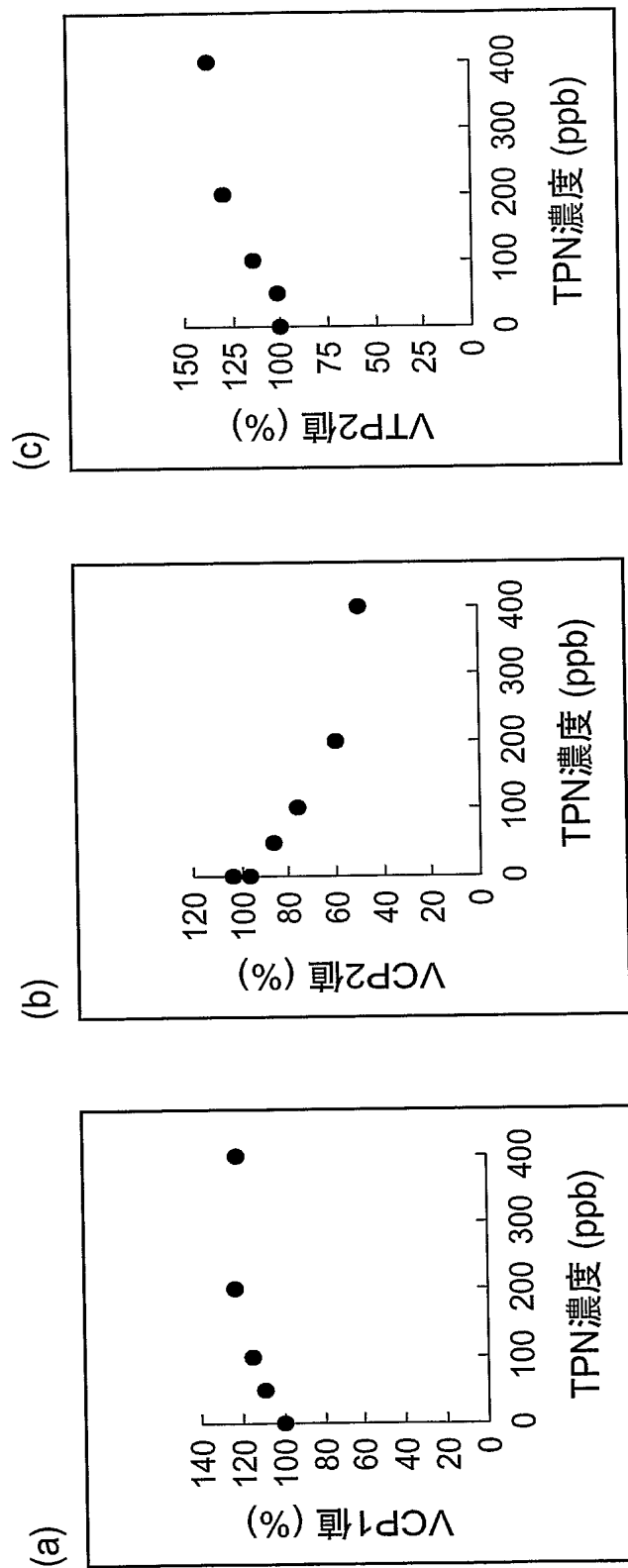
【図 18】



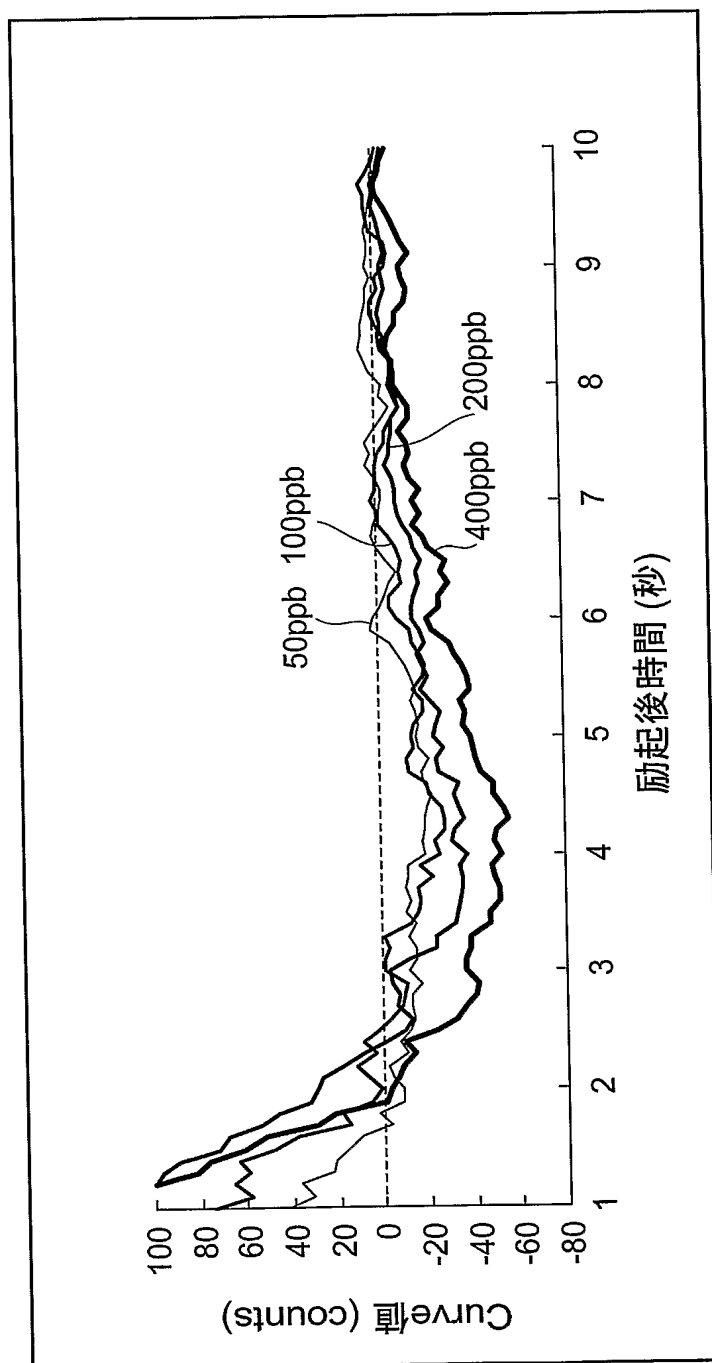
【図 19】



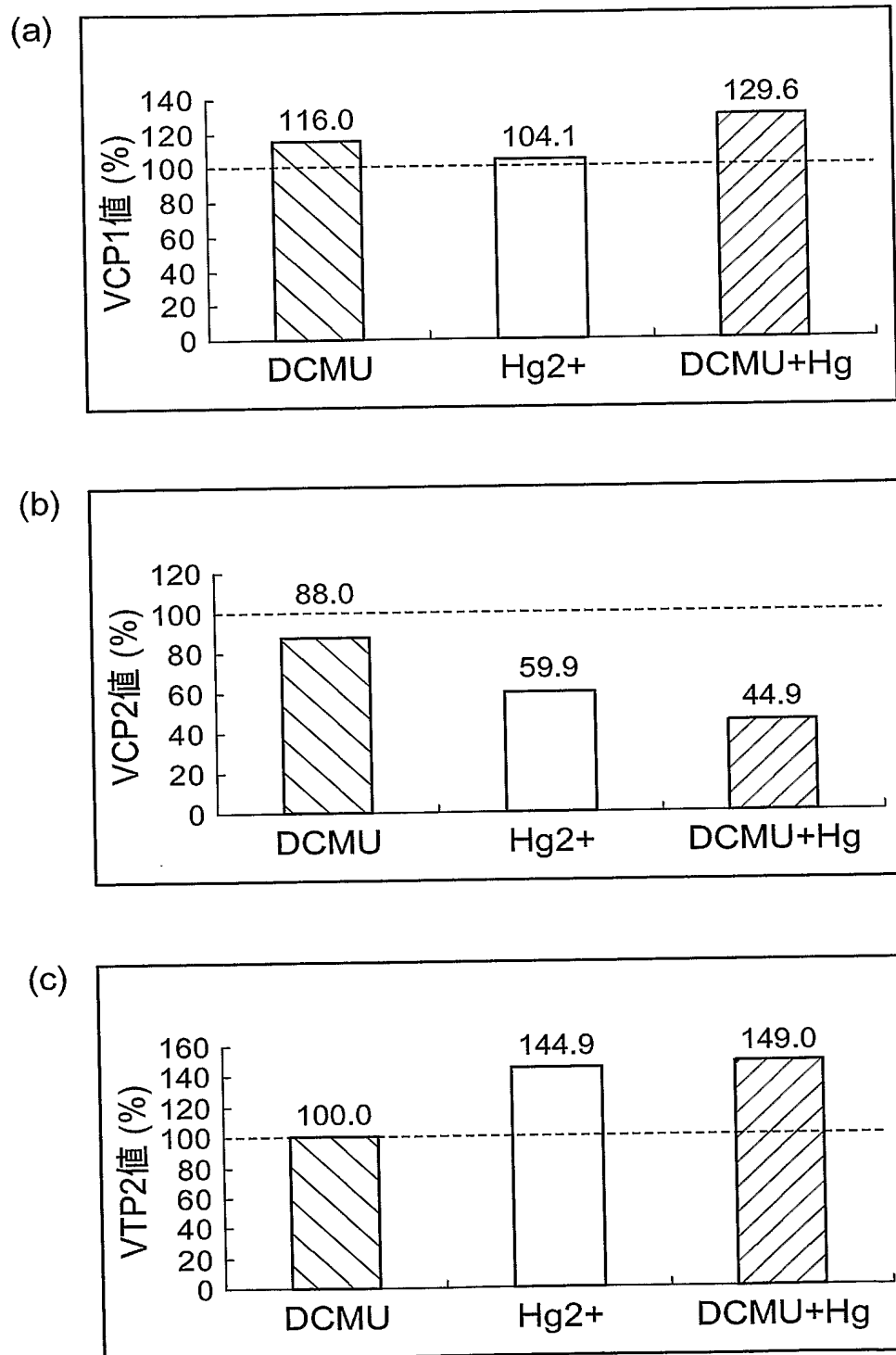
【図 20】



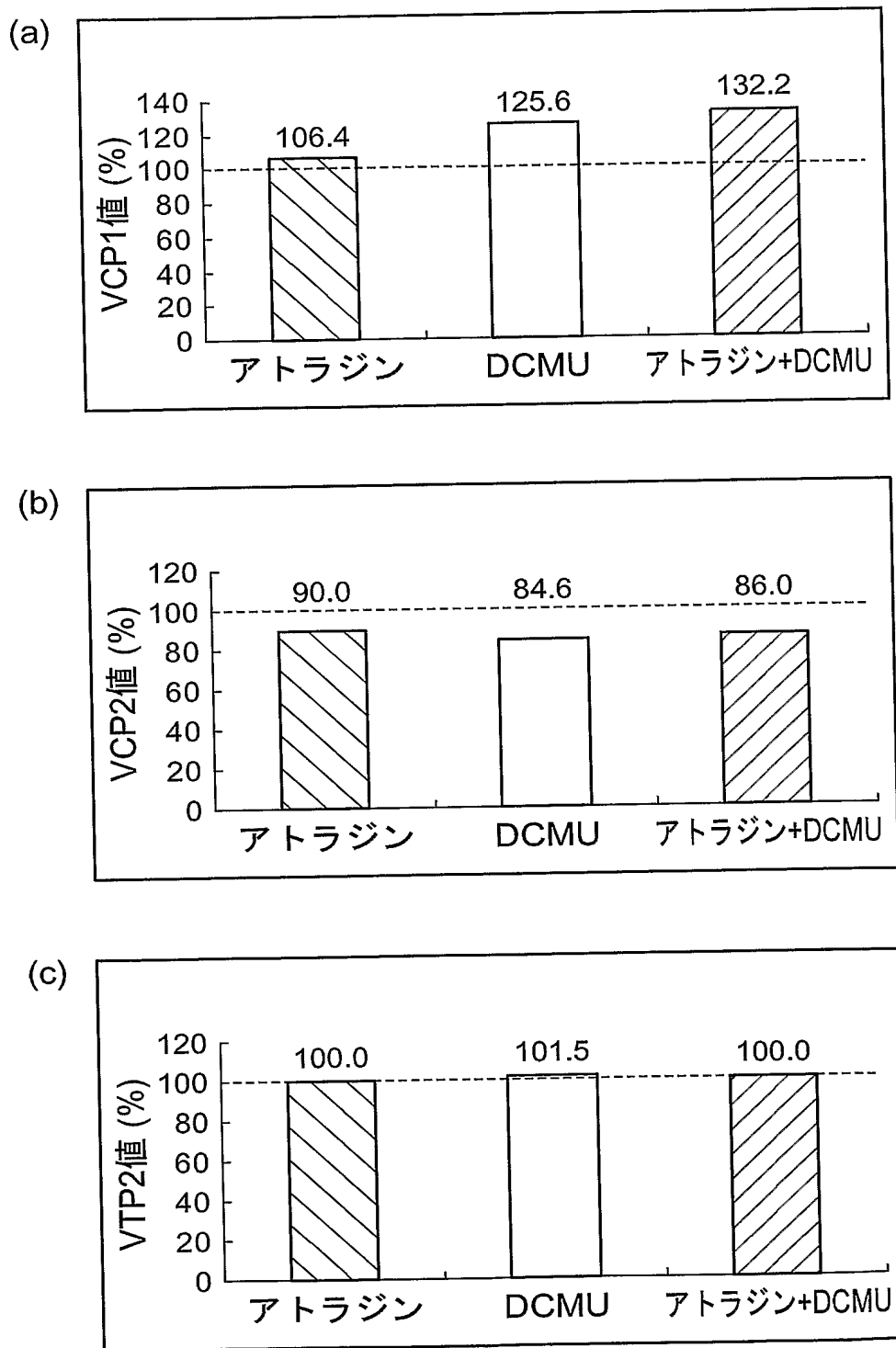
【図 21】



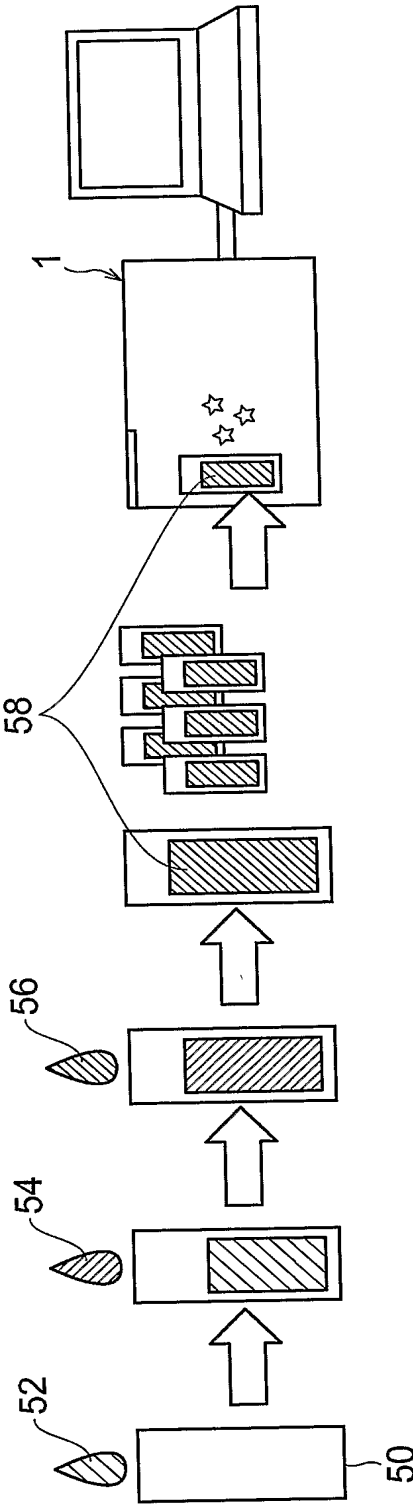
【図 22】



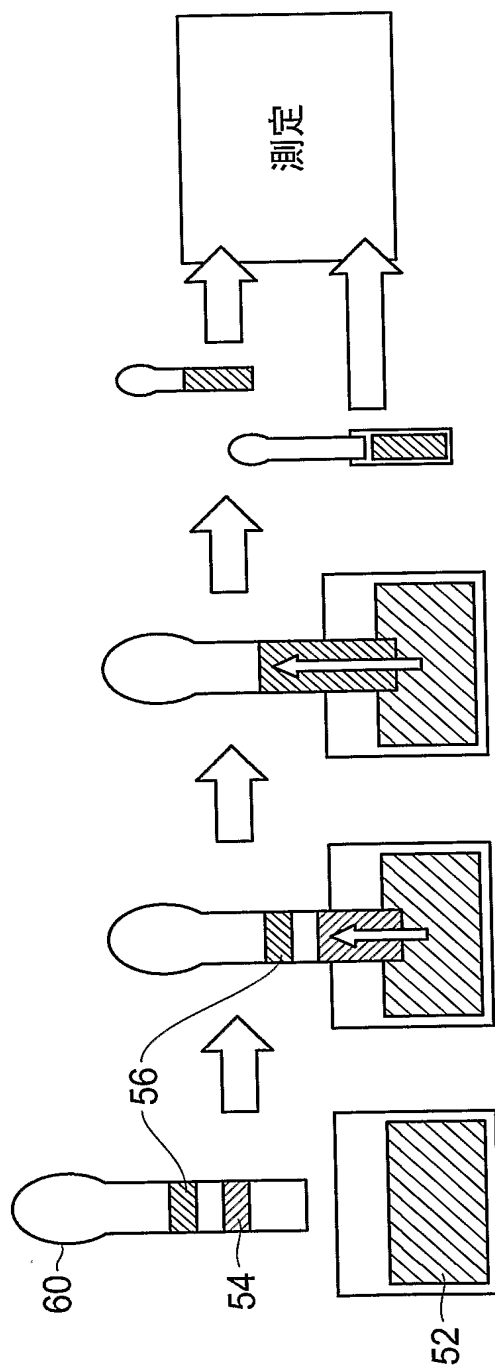
【図 23】



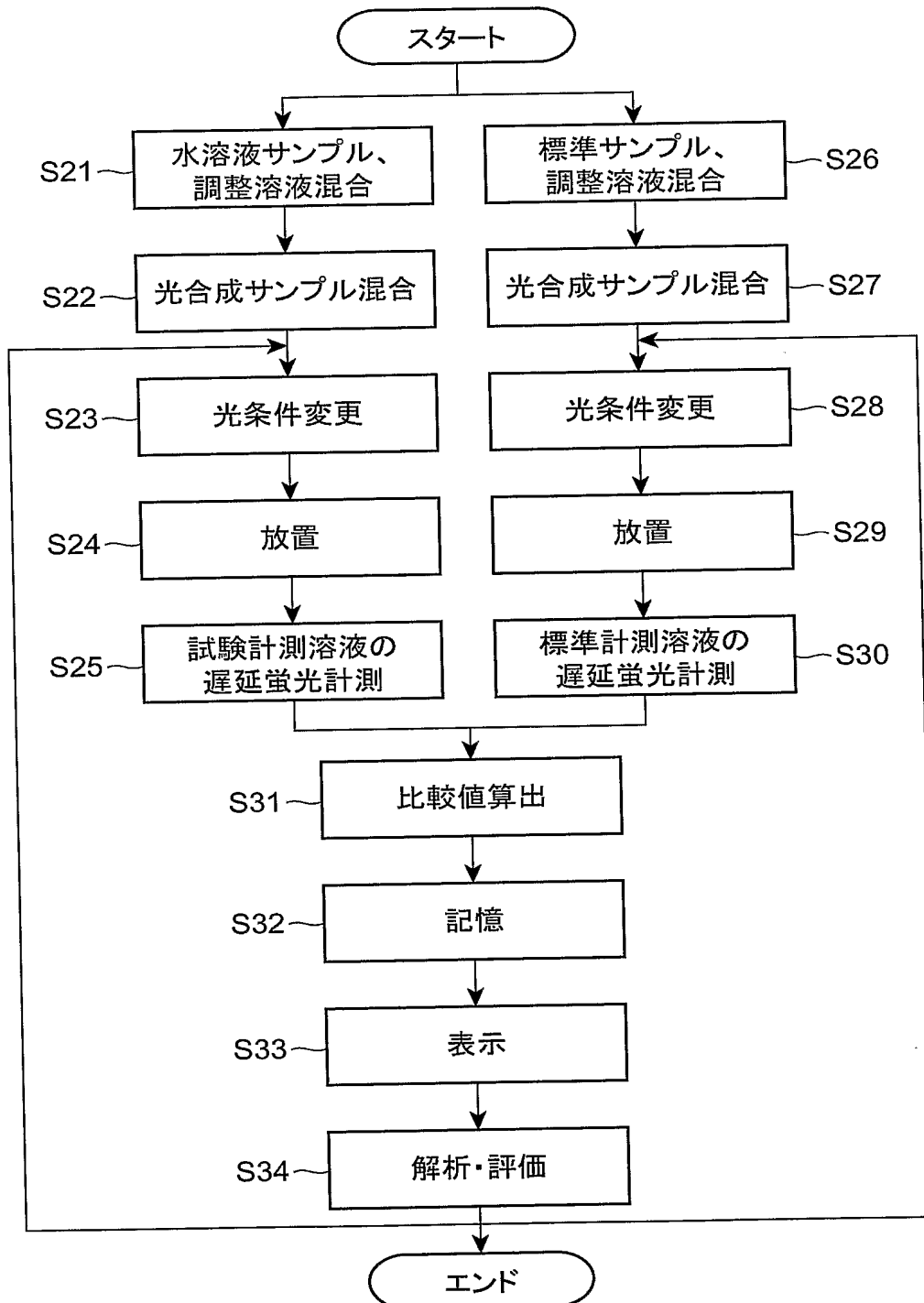
【図 24】



【図 25】

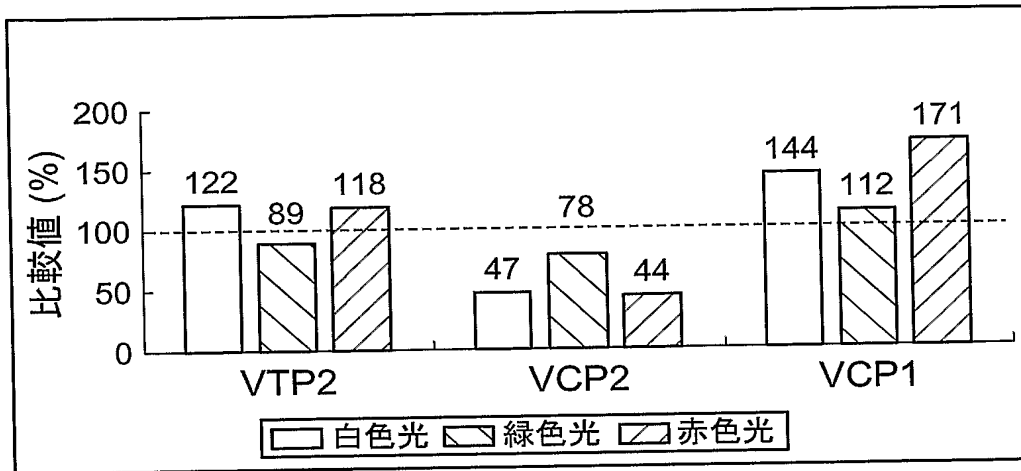


【図 26】

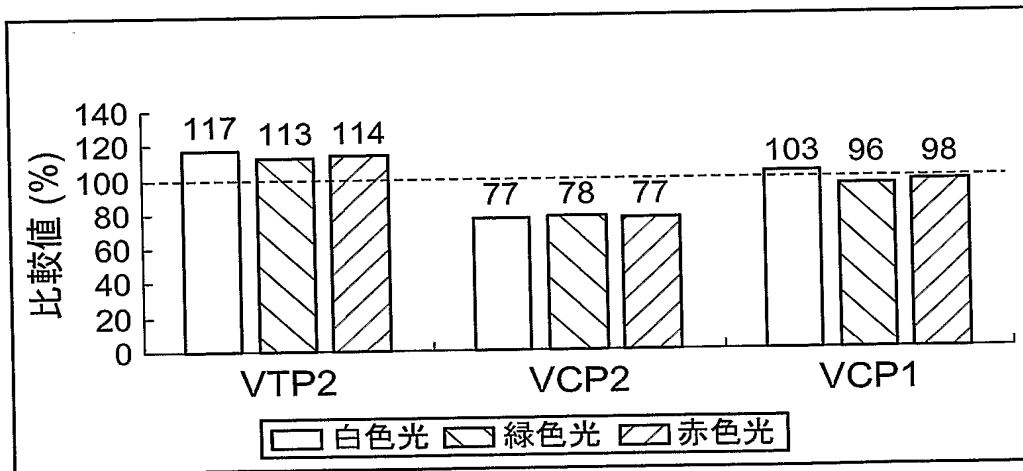


【図 27】

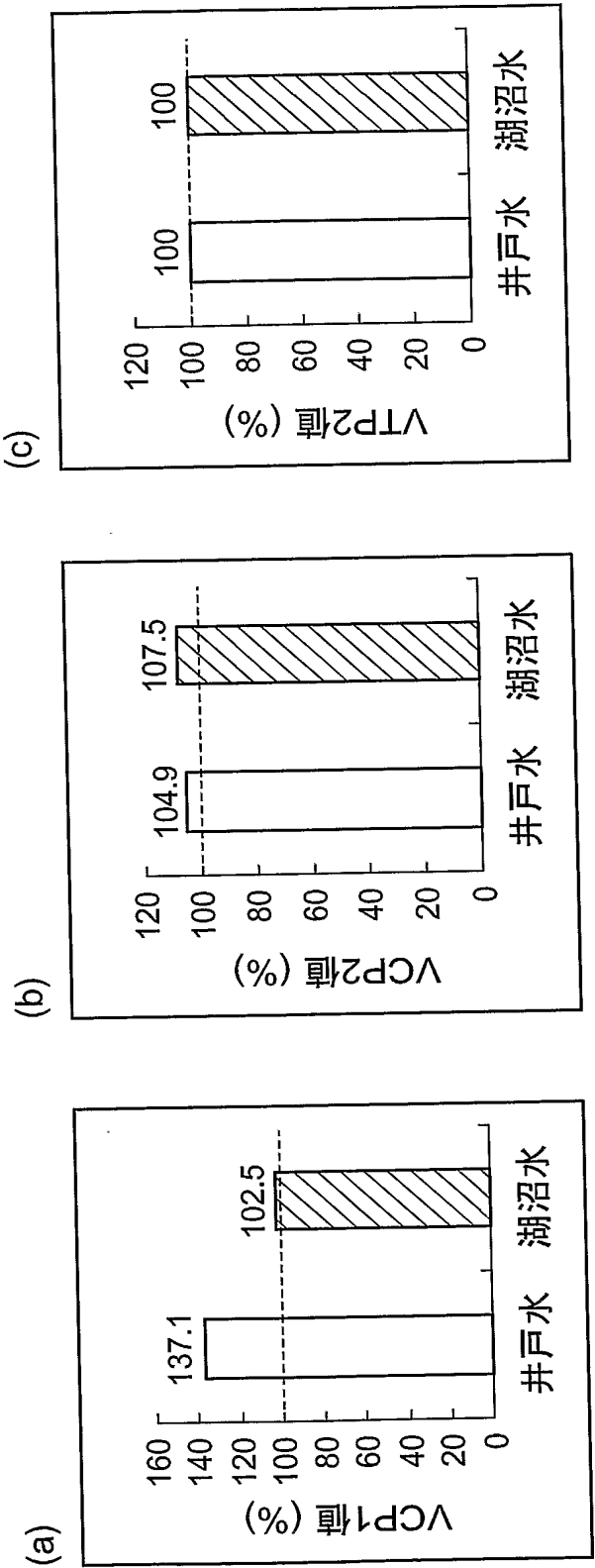
(a)



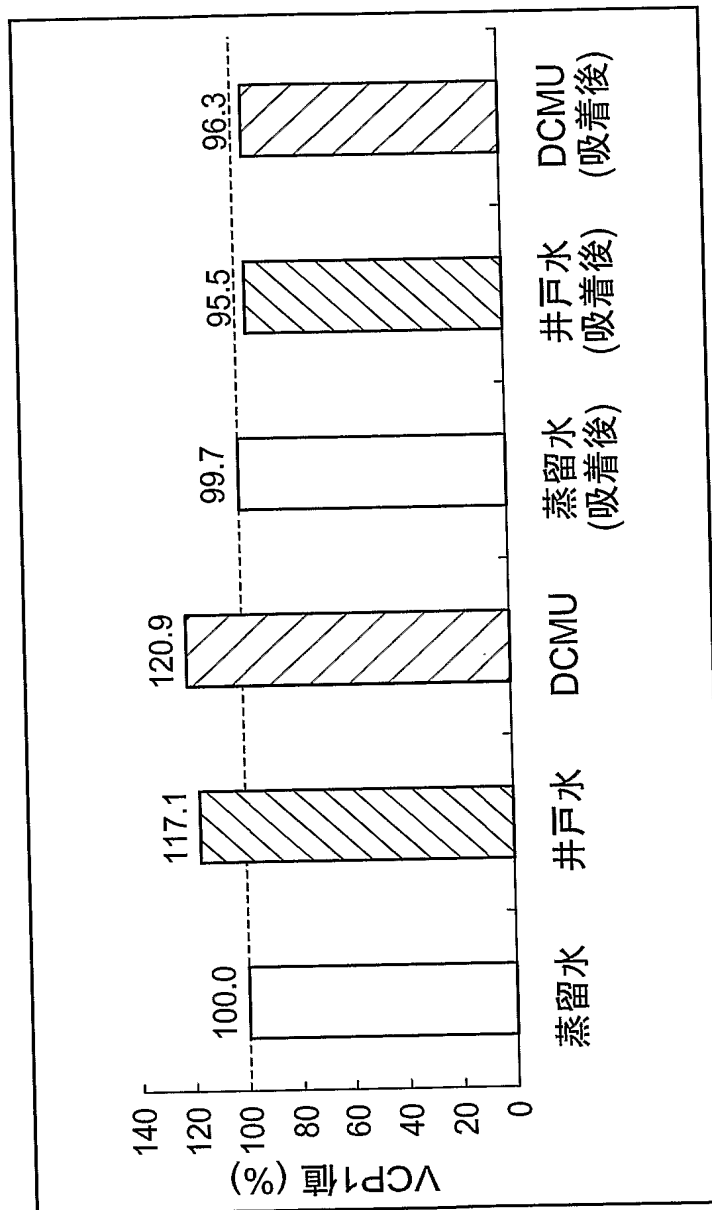
(b)



【図 28】



【図 29】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 短時間で幅広い阻害要因の分析を行うことが可能な生物生育阻害要因の評価方法を提供すること。

【解決手段】 この生物生育阻害要因の評価方法は、水溶液サンプルに光合成サンプルを混合して試験計測溶液を調製し、試験計測溶液を放置し、試験計測溶液に所定の照射時間光を照射した後に、発生する遅延蛍光の光量を計測する第1のステップと、生物生育阻害要因が存在しない標準サンプルに、光合成サンプルを混合して標準計測溶液を調製し、標準計測溶液を放置し、標準計測溶液に所定の照射時間光を照射した後に、発生する遅延蛍光の光量を計測する第2のステップと、第1のステップ及び第2のステップでそれぞれ計測された遅延蛍光の光量に基づいて評価値を算出し、評価値の比較値を求めることにより生物生育阻害要因を評価する第3のステップと、を備える。

【選択図】 図3

特願 2 0 0 3 - 4 2 1 9 4 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 2 3 6 4 3 6]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

静岡県浜松市市野町 1 1 2 6 番地の 1

氏 名

浜松ホトニクス株式会社